

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**IMUNOTERAPIA CONTRA PITIOSE:
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS
BRASILEIROS DE *Pythium insidiosum***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maria Isabel de Azevedo

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**IMUNOTERAPIA CONTRA PITIOSE: CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ISOLADOS BRASILEIROS DE
*Pythium insidiosum***

por

Maria Isabel de Azevedo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**IMUNOTERAPIA CONTRA PITIOSE: CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ISOLADOS BRASILEIROS DE
*Pythium insidiosum***

elaborada por
Maria Isabel de Azevedo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Janio Moraes Santurio, Dr.
(Presidente/Orientador)

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra.
(UFSM)

Érico Silva de Loreto, Dr.
(UFSM)

Santa Maria, Julho de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Dario e Marlene por
terem me ensinado que a felicidade
está na simplicidade da vida e que a
humildade é peça fundamental
para seguir em frente...

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos e jamais me abandonar.

Aos meus pais pelo afeto, pelo carinho e pela confiança. Vocês são meus maiores exemplos de amor, dedicação e caráter. Obrigada por nunca me desampararem.

A minha irmã Simone que mesmo distante sempre foi uma das maiores incentivadoras dos meus estudos. Ao meu irmão Maurício pelos conselhos, carinho e incentivos.

Ao professor Janio Moraes Santurio pelos conhecimentos, mas principalmente pela oportunidade, confiança e amizade destes quase 7 anos que trabalhamos juntos, que jamais esquecerei e sempre serei grata.

Ao professor Sydney Hartz Alves pela amizade, apoio, conhecimentos e valiosos conselhos;

A professora Sônia Botton, pela amizade, pelo apoio e principalmente pela sua disposição em me ajudar. Seu auxílio foi imprescindível na concretização deste trabalho;

A professora e amiga Daniela Pereira pelo carinho, pelos conselhos, pelas orientações e por me convidar a participar deste estudo.

A professora Lizandra Robe, pelo auxílio e importantes ensinamentos que muito enriqueceram este trabalho.

Ao Thiago pelo carinho, pelas lições de convivência e principalmente por cuidar tão bem de mim durante o período de conclusão desta dissertação.

Aos amigos e irmãos do Lapemi, obrigada pela colaboração de todos, em especial a Camilinha e a Fran que colaboraram na execução deste estudo. A Claudinha que muito me auxiliou no PEG, não me deixando desistir. E a todos os outros: Fernandinha (minha companheira de caminhadas pela universidade) Patrique, Carlinha, Deise Mahl, Natália, Régis, Marcela, Maiara, Érico, Dani, Lucas, Letícia Deise M, Marcelo... Muito obrigada, pela amizade.

A todos os amigos que me auxiliaram neste período.

A Universidade Federal de Santa Maria por todos estes anos de ensino público, gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia pela oportunidade, pelo ensino e pelo acolhimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim.....MUITO OBRIGADA!!!!

Três coisas

“De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção, um caminho novo...

Da queda, um passo da dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro..."

Fernando Pessoa

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

IMUNOTERAPIA CONTRA PITIOSE: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Pythium insidiosum*

Autor: Maria Isabel de Azevedo
Orientador: Janio Morais Santurio
Data da Defesa: Santa Maria, 15 Julho de 2011.

O *Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático causador da pitiose, uma importante enfermidade em humanos e animais, sendo prevalente em áreas tropicais e subtropicais. No Brasil foi relatada pela primeira vez em 1974. Desde então vários casos desta enfermidade tem sido descritos por todo o país. Os insucessos de terapias antifúngicas aliados aos casos não responsivos à imunoterapia existente impulsionam estudos moleculares a fim de investigar possíveis variações genéticas entre os isolados brasileiros de forma a contribuir nas pesquisas para a melhoria do imunoterápico disponível. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a diversidade genética de 30 isolados de *P. insidiosum* provenientes de diferentes regiões do Brasil, bem como compará-los com isolados tailandeses, um isolado da América Central e outro isolado da América do Norte através do sequenciamento e das análises das regiões do DNA genômico correspondentes à citocromo c oxidase (COX II) e ITS1, 5.8S rRNA e ITS2 do rDNA (ITS). As análises das sequências de nucleotídeos de ambas as regiões foram realizadas, individualmente e em combinação, utilizando as seguintes metodologias: máxima parcimônia (*Maximum parsimony*, MP); Neighbor-joining (NJ); máxima verossimilhança (*Maximum likelihood*, ML); e análise Bayesiana (*Bayesian analysis*, BA). Os dados demonstraram que todos os isolados de *P. insidiosum* são monofiléticos em relação às outras espécies de *Pythium*. A análise das sequências do gene COX II subdividiu os isolados de *P. insidiosum* em três grupos, cuja disposição demonstra os isolados tailandeses como parafilético em relação aos isolados brasileiros. As análises moleculares realizadas neste estudo sugerem uma proximidade evolutiva entre todos os isolados americanos, incluindo os brasileiros, da Costa Rica e dos Estados Unidos, os quais foram agrupados juntos em um único grupo. Na análise de *network* do gene COX II os resultados apresentaram sinais de uma recente expansão dos isolados de *P. insidiosum* para a América, provavelmente oriundos do continente asiático. Pela análise do gene COX II foi possível evidenciar os maiores níveis de variabilidade genética entre os isolados de *P. insidiosum* avaliados, além disso, foram demonstrados os maiores níveis de informação filogenética, quando comparada à análise da região ITS. Contudo, os dois marcadores genéticos selecionados para este estudo revelaram-se inteiramente congruentes nas relações filogenéticas entre os isolados brasileiros de *P. insidiosum*, reunindo-os em um único grupo monofilético o qual não demonstrou haver variabilidade genética. Os resultados obtidos indicam que a cepa utilizada na produção do imunoterápico Pitium-Vac[®] é representativa dos isolados brasileiros de *P. insidiosum*.

Palavras-chave: Pitiose, *Pythium insidiosum*, caracterização molecular, filogenia, imunoterapia.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

IMMUNETHERAPY AGAINST PYTHIOSIS: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN ISOLATES OF *Pythium insidiosum*

Autor: Maria Isabel de Azevedo
Orientador: Janio Morais Santurio
Data da Defesa: Santa Maria, 15 de Julho de 2011.

The *Pythium insidiosum* is an aquatic oomycete that is the causative agent of pythiosis, an important disease in humans and animals that is prevalent in tropical and subtropical areas. In Brazil it was first reported in 1974, then several cases this disease has been reported throughout the country. The failure in the antifungal therapy combined with cases unresponsive to immunotherapy existing, lead to molecular studies in order to investigate possible genetic variations among Brazilian isolates, and this may be able to contribute on the research for the improvement of immunotherapy available. Thus, this study aimed to evaluate the genetic diversity of thirty *P. insidiosum* isolates from different regions of Brazil, and compare all of them with isolates from Thailand, one isolate from Central America and another isolate from North America, by sequencing and the analysis of genomic DNA regions corresponding to cytochrome c oxidase (COX II) and ITS1, 5.8S rRNA and ITS2 rDNA (ITS). The analyses of nucleotide sequences of both regions were carried out, individually and in combination, using the following methods: Maximum parsimony (MP); Neighbor-joining (NJ); Maximum likelihood (ML); and Bayesian analysis (BA). Our data demonstrated all of *P. insidiosum* isolates as monophyletic in relation to the other *Pythium* species. Analyses of COX II gene sequences subdivided *P. insidiosum* isolates into three groups, whose arrangement provides the Thai isolates as paraphyletic in relation to the Brazilian isolates. The molecular analyses performed in this study suggest an evolutionary proximity among all of American isolates, including the Brazilian, from Costa Rica and from the United States, that were grouped in a single group. COX II gene network analysis showed signs of a recent expansion of *P. insidiosum* isolates, probably originated from the Asiatic to America continent. By analysis of COX II gene demonstrated the highest levels of genetic variability among *P. insidiosum* isolates studied in here, additionally, the highest levels of phylogenetic information were shown, when it was compared to the ITS region analysis. Nevertheless, both genetic markers selected for this study proved to be entirely congruent in the phylogenetic relations among Brazilian isolates of *P. insidiosum*, since clustered all of them into a single monophyletic group which did not shown to have genetic variability. The results indicate that the strain used in the production of the immunotherapeutic - Pitium-Vac[®] - is representative of the Brazilian isolates of *P. insidiosum*.

Keywords: Pythiosis, *Pythium insidiosum*, molecular characterization, phylogeny, immunotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figure 1. Bayesian analysis (BA) majority-rule consensus tree based on cytochrome oxidase II (*COX II*) sequences. The posterior probability of each clade is indicated beside its respective internal node. At the front of the internal branches there is an arbitrarily defined letter representing the clade that follows and which can be used to interpret Table 3.....50

Figure 2. Bayesian analysis (BA) majority-rule consensus tree based on rDNA ITS region sequences. The posterior probability of each clade is indicated beside its respective internal node. At the front of the internal branches there is an arbitrarily defined letter representing the clade that follows and which can be used to interpret Table 3.....51

Figure 3. Bayesian analysis (BA) majority-rule consensus tree based on matrix containing *ITS + COX II*. The posterior probability of each clade is indicated beside its respective internal node. At the front of the internal branches there is an arbitrarily defined letter representing the clade that follows and which can be used to interpret Table 3.....52

Figure 4. Network obtained for the *COX II* haplotypes of *P. insidiosum*. Haplotypes are represented by circles, whose area is proportional to frequency, and numbers in the lines connecting circles indicate substitutions. Minor red circles denote inferred haplotypes.....55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. List of isolates of <i>Pythium</i> and <i>Lagenidium</i> species used in this study for internal transcribed spacer regions (ITS) and cytochrome c oxidase subunit II (COX II) DNA coding sequences.....	45
Table 2. Properties of each of the used molecular dataset.....	49
Table 3. Bootstrap values presented for each of the clades shown in Fig.1, Fig. 2 and Fig. 3 by the trees constructed using different phylogenetic reconstruction methods.....	53
Table 4. COX II nucleotide diversity values for each of the <i>P.insidiosum</i> clades (Figure 1).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
BA	<i>Bayesian Analysis</i> , Análise Bayesiana
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COXII	<i>Cytochrome c oxidase subunit II</i>
dNTP	Desoxiribonucleotídeos Fosfatados
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GTR+G	<i>General Time Reversible plus Gamma</i>
HKY+G	<i>Hasegawa-Kishino-Yano plus Gamma</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
IGS	<i>Intergenic Spacer</i>
LAPEMI	Laboratório de Pesquisas Micológicas
mtDNA	Ácido Desoxirribonucléico Mitocondrial
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
ML	<i>Maximum likelihood analysis</i> , Análise por Máxima Verossimilhança
MP	<i>Maximum parsimony analysis</i> , Análise por Máxima Parcimônia
nDNA	Ácido desoxirribonucléico nuclear

ng	Nanogramas
NJ	<i>Neighbor-joining analysis</i> , Análise por Neighbor-joining
OTUSs	<i>Operational Taxonomic Units</i>
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação em cadeia de polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RPM	Rotação por Minuto
TRB	<i>Tree-Bisection-Reconnection</i>
TVM+I+G	<i>Transversional Model plus Proportion of Invariable plus Gamma</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
SUMÁRIO	xiv
APRESENTAÇÃO	xv
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral:	19
2.2. Objetivos específicos:	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1. <i>Pythium insidiosum</i>	20
3.1.1 Histórico e Classificação.....	20
3.1.2. Características do Oomiceto	22
3.1.3. Filogenia Molecular <i>do P. insidiosum</i>	23
3.2. Pitiose.....	24
3.2.1. Diagnóstico	28
3.2.2. Tratamento	28
3.3. Análise Molecular	32
3.3.1. Filogenia Molecular.....	32
3.3.2. Genoma Nuclear e Mitocondrial: Marcadores Filogenéticos.	33
3.3.3. Métodos de Reconstrução Filogenética	34
4. ARTIGO CIENTÍFICO	37
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	67
7. PERSPECTIVAS	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. APÊNDICE	84
GLOSSÁRIO	85

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As secções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um micro-organismo aquático, classificado no Reino Stramenopila, filo Oomycota, família Pythiaceae, gênero *Pythium* e espécie *insidiosum* (ALEXOPOULOS et al., 1996). As análises filogenéticas demonstraram que as espécies de *Pythium* estão mais relacionadas às diatomáceas e algas do que aos fungos verdadeiros (SCHURKO et al., 2003a,b). Esta é a única espécie conhecida de *Pythium* patogênica para humanos e animais causando uma enfermidade crônica conhecida por pitiose (KRAJAEJUN et al., 2002). Esta doença ocorre, principalmente, em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (MENDOZA et al., 1996; KAUFMAN, 1998; TABOSA et al., 2004; RIVIERRE et al., 2005), tendo sido relatada nas Américas, Europa, no sudeste asiático e na Oceania (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996; MENDOZA et al., 1996). A pitiose é frequentemente observada na espécie equina e canina, mas casos esporádicos também têm sido relatados em bovinos (MILLER et al., 1985; PEREZ et al., 2005), felinos (BISSONNETTE et al., 1991; RAKICH et al., 2005), ovinos (TABOSA et al., 2004; SANTURIO et al., 2008) e aves (PESAVENTO et al., 2008). Casos de pitiose também foram descritos em espécies de animais selvagens, tais como: urso, jaguar e camelos (GROOTERS, 2003; CAMUS et al., 2004; WELLEHAN et al., 2004, VIDELA et al., 2011).

Em humanos, a pitiose é uma enfermidade comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, onde vários casos têm sido notificados (DE COCK, 1987; IMWIDTHAYA, 1994a), apresentando prognóstico desfavorável, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade (TANPHAICHITRA, 1989; CHETCHOTISAKD et al., 1992; VIRGILE et al., 1993; WANACHIWANAWIN et al., 2004; BOSCO et al., 2005; PUPAIBOOL et al., 2006). No homem, as infecções por *P. insidiosum* caracterizam-se por formas cutâneas, subcutâneas e sistêmicas, envolvendo o sistema cardiovascular, o que geralmente provoca oclusão arterial. A maioria dos casos sistêmicos tem sido relatada em pessoas portadoras de α ou β talassemia, chamada de “anemia mediterrânea”. Esta é uma doença hereditária caracterizada pela deficiência ou ausência da produção das cadeias α ou β da hemoglobina, respectivamente (LI et al., 2006). Vários tratamentos já foram utilizados, todavia a intervenção cirúrgica, com a

retirada de toda a área afetada, permanece sendo o tratamento mais efetivo (KRAJAEJUN et al., 2006). Recentemente, SUDJARITRUK & SIRISANTHANA (2011) relataram o sucesso obtido pelo uso de um imunoterápico aliado à associação de antifúngicos e procedimento cirúrgico no tratamento de um caso de pitiose humana na Tailândia.

Nos animais, a pitiose é prevalente na espécie equina, cursando com lesões ulcerativas, proliferativas e piogranulomatosas. Na maioria das vezes, pele e tecido subcutâneo dos membros e parede ventral (MILLER & CAMPBELL, 1982b) são os locais mais afetados; porém existem relatos da doença comentando outros órgãos como os pulmões (GOAD, 1984), os ossos (MENDOZA et al., 1988; ALFARO & MENDOZA, 1990) e o intestino (BROWN & ROBERTS, 1988, ALLISSON & GILLIS, 1990) de equinos. As lesões são constituídas por tecido granulomatoso, apresentando “sinus” dentro dos quais se desenvolvem pequenas massas semelhantes a corais, conhecidas como “kunkers”, que são formados por eosinófilos degranulados intercalados com hifas viáveis de *P. insidiosum*, sendo encontrados somente na pitiose equina (CHAFFIN et al., 1995; MENDOZA et al., 1996).

O tratamento da pitiose em animais e humanos é limitado principalmente pelas características do agente, notadamente pela ausência de ergosterol na membrana plasmática, componente alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas. Com isso, os agentes antifúngicos comercialmente disponíveis apresentam baixa eficiência e a maioria dos animais atingidos, não sobrevive à infecção (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Devido às dificuldades na terapêutica da pitiose, a imunoterapia surgiu como uma alternativa para o tratamento da enfermidade em equinos. MILLER (1981) desenvolveu um imunoterápico a partir de culturas do próprio agente contendo hifas sonicadas; entretanto uma nova metodologia para aprimorar a imunoterapia foi realizada por SANTURIO et al. (2003). Neste novo procedimento de preparo foi incluída a liofilização do imunoterápico, aumentando o prazo de validade, além de proporcionar a liberação gradual de antígenos a partir da massa micelial macerada ou liquidificada. Para a produção do imunoterápico brasileiro utiliza-se apenas um isolado de *P. insidiosum*, pois é a única cepa do Brasil caracterizada molecularmente e depositada no *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) com o a identificação de CBS 101555, correspondente ao isolado LAPEMI118.

A habilidade de distinguir *P. insidiosum* de outras espécies de *Pythium* e de outros organismos que podem causar sinais clínicos similares é crucial para o tratamento da doença (SCHURKO et al., 2003a). O desenvolvimento de técnicas de fixação de complemento (MILLER & CAMPBELL, 1982a), imunodifusão (MENDOZA et al., 1986), anticorpos fluorescentes (MENDOZA et al., 1989), imunoperoxidase (BROWN et al., 1988), *imunoblot*

(MENDOZA et al., 1992) e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (MENDOZA et al., 1997) auxiliam e suportam um diagnóstico seguro. O uso de técnicas de biologia molecular também tem sido uma ferramenta bastante útil para identificar as diferentes espécies de *Pythium* (WANG & WHITE, 1997).

Estudos moleculares têm sido relatados para a identificação e filogenia de *P. insidiosum*. SCHURKO et al., (2003 a,b) analisaram a filogenia e caracterização molecular de isolados de *P. insidiosum* originários das Américas, Ásia e Austrália pela comparação das regiões que compreendem o espaço ribossomal intergênico (*intergenic spacer*, IGS e *internal transcribed spacer*, ITS) usando as técnicas de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e sequenciamento de DNA. Esses autores demonstraram haver variações genéticas entre os isolados de *P. insidiosum* das 3 regiões estudadas, havendo a possibilidade de não serem todas da mesma espécie. Somente um isolado de *P. insidiosum* originário do Brasil (CBS 101555-LAPEMI118) foi analisado nesse estudo. Pesquisas mais recentes envolvendo diferentes abordagens moleculares de *P. insidiosum* foram publicadas. No estudo das relações filogenéticas, KAMMARNJESADAKUL et al., (2011) empregaram dois marcadores gênicos, a citocromo c oxidase II (COX II) e o espaço ribossomal intergênico (ITS), para analisar cepas de *P. insidiosum* oriundas de seres humanos e fontes ambientais da Tailândia. Nesta investigação ficou evidenciada a importância da região COXII para a classificação filogenética de fungos. KRAJAEJUN et al., (2011) realizaram a busca por possíveis genes codificantes de fatores de virulência utilizando um isolado humano de *P. insidiosum* da Tailândia. Ao analisar a homologia entre as sequências obtidas pela construção de bibliotecas genômicas de cDNA e as sequências gênicas de outros oomicetos depositadas em banco de dados, demonstraram a existência de vários genes que podem codificar fatores de virulência do *P. insidiosum*.

No Brasil, a imunoterapia tem sido amplamente utilizada no tratamento da pitiose equina, porém, existem casos não responsivos a esta terapêutica. Diante deste fato, pesquisas envolvendo o aprimoramento do imunoterápico existente são estimuladas. A busca por possíveis variações moleculares entre o isolado CBS101555-LAPEMI118 utilizado na produção do imunoterápico e isolados de *P. insidiosum* de outras regiões do Brasil impulsionou o desenvolvimento deste trabalho, verificando a possibilidade da inclusão de outros isolados na produção do imunoterápico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

- Realizar a caracterização molecular de isolados de *Pythium insidiosum* oriundos de doença clínica em animais de diferentes regiões do Brasil.

2.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar filogeneticamente os isolados de *P. insidiosum* provenientes de diferentes regiões do Brasil;
- Avaliar a diversidade genética dos isolados brasileiros de *P. insidiosum* a partir de dois marcadores gênicos: ITS e COX II.
- Verificar se o isolado de *P. insidiosum* CBS 101555-LAPEMI118, utilizado para a produção do imunoterápico Pitium-Vac[®], é representativo do perfil molecular dos isolados brasileiros.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Pythium insidiosum*

3.1.1 Histórico e Classificação

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático agente etiológico da pitiose. É provável que os primeiros relatos sobre a pitiose tenham sido realizados por SMITH (1884) e DROUIN (1896), os quais observaram a natureza micelial do agente etiológico. Embora o organismo pudesse ser cultivado, não foi possível identificá-lo, pois não esporulava, e, portanto, foi assumido ser um fungo “zigomiceto” ou “ficomiceto” baseado nas características de suas hifas vegetativas. Em 1901, De HAAN & HOOGKAMER fizeram uma extensa descrição de alguns casos da doença em cavalos na Indonésia e a nomearam de *Hyphomycosis destruens*. Somente em 1961 o agente foi identificado, por BRIDGES & EMMONS recebendo o nome de *Hyphomyces destruens*, o qual foi considerado um ficomiceto, com base na sua morfologia, apresentando hifas largas, bastante ramificadas, esparsadamente septadas, com ausência de esporulação nas culturas isoladas de oito equinos.

Em 1974, AUSTWICK & COPLAND verificaram a capacidade desse agente em produzir zoósporos biflagelados, quando transferidos para meio aquoso, permitindo classificá-lo como um fungo da família Pythiaceae, ordem Peronosporales que deveria ser incluído no gênero *Pythium*. No entanto, a denominação *Hyphomyces destruens* continuou sendo utilizada nas descrições da doença (McMULLAN et al., 1977; MURRAY et al., 1978). No Japão, ICHITANI & AMEMIYA (1980), comparando um isolado de equino com outras espécies de *Pythium*, através de suas características reprodutivas sexuadas e assexuadas, identificaram o agente como *P. gracile*. Somente DE COCK et al., (1987) ao analisarem isolados de equinos da Costa Rica, Papua, Nova Guiné e Japão, e de caninos dos Estados Unidos, concluíram que todos apresentavam as mesmas características, sendo então classificados como *P. insidiosum*. Concomitante a este estudo, SHIPTON (1987) analisando isolados provenientes de equinos na Austrália, propôs uma nova espécie, então denominada *P. destruens*. Entretanto, MENDOZA et

al., (1987) avaliaram a relação antigênica entre amostras de *P. insidiosum* isoladas de animais e *Pythium* spp isolados de plantas e solo, utilizando a técnica de imunodifusão e anticorpos fluorescentes, demonstrando que os isolados provenientes de caninos, equinos e humanos foram idênticos entre si e diferentes das amostras de plantas e solo. Neste trabalho, os autores confirmaram que *P. gracile* era antigenicamente idêntico à *P. insidiosum*.

Em 1989, MENDOZA & MARIN realizaram provas sorológicas utilizando antisoro produzido em coelhos e soro de equinos com pitiose frente a antígenos de cepas de *P. insidiosum* e antígenos de *P. destruens*, espécie reconhecida por SHIPTON (1987), em um estudo analisando um isolado equino. Neste estudo foi reconhecida a semelhança antigênica entre as duas espécies, determinando que se tratava do mesmo agente, sendo estabelecida a nomenclatura definitiva de *Pythium insidiosum* para o agente causador da pitiose (MENDOZA & MARIN, 1989). Embora o nome do agente tenha sido estabelecido, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida nos anos seguintes. Segundo DE COCK et al., (1987), os oomicetos são seres eucariotos produtores de zoósporos biflagelos, característica comum a *P. insidiosum*, que o incluía na ordem Peronosporales, filo Oomycota e reino Protoctista. Mais tarde, MENDOZA et al., (1996) realizaram estudos de classificação e caracterização do reino Prototista, sugerindo que *P. insidiosum* fosse classificado no reino Chromista, filo Pseudo-fungi, classe Oomycetes, ordem Pythiales e família Pythiaceae. Entretanto, estudos de classificação dos fungos, dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: Fungi, Stramenopila e Protista (ALEXOPOULOS et al., 1996). Baseado nessa nova classificação, o agente etiológico da pitiose pertence ao Reino Stramenopila, Filo Oomycota, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e Espécie *insidiosum* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Estudos taxonômicos mais aprofundados, baseados no sequenciamento de gene do RNA ribossomal e análise filogenética de *P. insidiosum*, confirmaram que os membros da classe Oomycetes são filogeneticamente distantes dos membros do reino Fungi e estariam relacionados de maneira mais próxima das algas que dos fungos (KWON-CHUNG, 1994). A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos está retratada ao nível celular através de diferenças na parede e na composição da membrana. A quitina, um componente essencial da parede celular fúngica, está geralmente ausente na parede celular dos oomicetos, onde aparecem como componentes predominantes a celulose e a β -glucana (HENDRIX, 1964). Os oomicetos se diferem dos fungos também quanto ao papel do ergosterol na membrana celular, ou seja, nos primeiros ele não é o principal esteróide. HENDRIX (1970) observou que em espécies dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium* e *Phytophthora*, os esteróis do ambiente eram incorporados à membrana, ao invés de serem sintetizados como ocorre com os fungos

verdadeiros. Em geral, esses esteróis são requeridos para a produção *in vitro* de estruturas reprodutivas, mas não necessariamente para o crescimento das hifas vegetativas (GROOTERS, 2003).

3.1.2. Características do Oomiceto *P. insidiosum*

Os membros do gênero *Pythium* estão distribuídos no mundo inteiro, sendo a maioria habitante do solo e da água, pertencentes ao Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, ordem Pythiales e Família Pythiaceae. Mais de 120 espécies de *Pythium* já foram descritas e, apesar de muitas serem patógenos de plantas economicamente importantes, *P. insidiosum* é o único patógeno de mamíferos reconhecido neste gênero (RIVIERRE et al., 2005).

A identificação das espécies de *Pythium* baseia-se principalmente nas características morfológicas de suas estruturas reprodutivas sexuais (oogonia e anterídio) e, em menor grau, através de suas estruturas reprodutivas assexuais (zoósporos) (ALEXOPOULOS et al., 1996). Durante muito tempo, o *P. insidiosum* foi tido como o único organismo zoospórico patógeno de mamíferos e, devido a isso, alguns autores sugeriram de forma equívoca que a produção de zoósporos identificava especificamente um isolado como sendo *P. insidiosum*. Hoje, se sabe que muitas características da reprodução assexuada são compartilhadas por membros dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium* e *Phytophthora*, inclusive a produção de zoósporos biflagelados móveis a partir de um zoosporângio (GROOTERS, 2003). DE COCK et al., (1987), em um estudo utilizando isolados animais com pitiose de diferentes partes do mundo, semearam estes isolados em diferentes meios, e observaram que zoósporos só foram produzidos nas culturas em água destilada. Assim como outros oomicetos, *P. insidiosum* cresce facilmente em uma variedade de meios de cultura. Em ágar farinha de milho (CMA), as colônias apresentam-se transparentes ou esbranquiçadas, submersas ao meio de cultura com micélio aéreo curto e padrão delicadamente radiado. O diâmetro das hifas cenocíticas varia entre 4 e 10 µm com ramificações perpendiculares laterais em ângulo reto. Septos são ocasionalmente observados em hifas jovens, porém são abundantes em culturas velhas (DE COCK et al., 1987; MENDOZA et al., 1996).

As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo em seu ecossistema. Segundo MILLER & CAMPBELL (1982b), para a produção de zoósporos móveis que se constituem a forma infectante, são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e o acúmulo de água em banhados e lagoas (MENDOZA et al., 1996). A grande maioria dos casos de pitiose foi observada durante ou após a estação chuvosa. No Pantanal brasileiro, a maioria

dos casos de pitiose equina é registrada entre os meses de fevereiro e maio (verão-outono), período que corresponde ao ápice das cheias (SANTURIO et al., 2006).

Um modelo de ciclo biológico foi proposto por MILLER, (1983), descrevendo o comportamento ambiental e a cadeia infecciosa desse fungo zoospórico. De acordo com esse modelo, o ciclo baseia-se na colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do organismo, dando origem aos zoosporângios. Os zoósporos livres na água movimentam-se até encontrar uma planta ou animal, onde se encistam e emitem o tubo germinativo, dando origem a um novo micélio e completando o seu ciclo. Análises *in vitro* demonstram a quimiotaxia dos zoósporos por pelos e por tecidos animais e vegetais é atribuída a substâncias presentes nestes tecidos. Uma substância amorfa é liberada pelo zoósporo após o seu encistamento, a qual é provavelmente uma resposta ao fator quimiotático do hospedeiro. Essa substância age como um adesivo para ligar o zoósporo à superfície do hospedeiro e permitir a formação de tubo germinativo (MENDOZA et al., 1993).

Pesquisas envolvendo os fatores de virulência deste oomiceto foram publicadas recentemente por KRAJAEJUN et al., (2011), evidenciando a existência de sequências gênicas possivelmente codificadoras de fatores de virulência. O isolado de um paciente com pitiose vascular foi utilizado para a construção de uma biblioteca de cDNAs. As sequências geradas através dessa construção foram comparadas com sequências codificadoras de fatores de virulência de outros oomicetos que estavam depositadas em banco de dados. Este estudo representa importante etapa no seqüenciamento do DNA e na identificação de genes do *P. insidiosum*, bem como o início da análise do seu transcriptoma.

3.1.3. Filogenia Molecular do *P. insidiosum*

Atualmente, as técnicas moleculares se constituem em importantes ferramentas para o diagnóstico, identificação e estudos filogenéticos de *P. insidiosum*. Os primeiros relatos de que mostram que *P. insidiosum* é um patógeno exclusivo de mamíferos vieram de estudos filogenéticos moleculares de várias espécies de *Pythium* (MARTIN, 2000; LÉVESQUE & DE COCK, 2004). LÉVESQUE & DE COCK (2004) os quais dividiram as espécies de *Pythium* em pelo menos 10 diferentes grupos filogenéticos (designados de A a K). *P. insidiosum* é encontrado no grupo C, juntamente com *P. grandiosporangium*. A proximidade entre *P. insidiosum* e este micro-organismo saprotrófico do mar é intrigante uma vez que *P. insidiosum* é um organismo de água doce. Além disso, as duas espécies são

significativamente diferentes em relação à morfologia e à temperatura de crescimento. O agrupamento dos dois em um grupo é mais provável que seja em consequência da atração de longo alcance, seguida, de uma estreita relação genuína.

SCHURKO et al., (2003a, b) observaram a heterogeneidade das sequências de DNA ribossomal (IGS e ITS) entre isolados de *P. insidiosum* correlacionando com a origem geográfica, mas não ao hospedeiro. Eles observaram três grupos distintos: grupo I foi constituído de isolados da América do Norte, Sul e Central, o grupo II consistiu em isolados da Ásia e Austrália, enquanto o grupo III continha isolados da Tailândia e Estados Unidos. Os grupos I e II estão intimamente relacionados, mas o grupo III é significativamente diferente dos outros dois. Além disso, um isolado de urso (*Tremarctos ornatus*) apresenta significativa diferença de todos os outros isolados que fazem parte destes três grupos. Este isolado portanto, pode representar um variante de *P. insidiosum* ou uma espécie diferente.

KAMMARNJESADAKUL et al., (2011) analisaram recentemente a relação filogenética entre 31 cepas de *P. insidiosum* isoladas de seres humanos e fontes ambientais da Tailândia e dois isolados de equino, sendo um da América do Norte e um da América Central. Neste estudo, os autores utilizaram a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para amplificar duas regiões a citocromo oxidase II (COX II) e o Espaço Ribossomal Intergênico (ITS). Todos os isolados tailandeses de casos clínicos e de fontes ambientais foram separados em dois grupos, enquanto os isolados das Américas foram agrupados em um terceiro grupo. Embora as duas regiões analisadas apresentassem distribuições semelhantes, a árvore filogenética da COX II demonstrou alta resolução em relação ao uso das sequências ITS. Este estudo sugeriu que o gene da COX II apresenta melhores resultados de análise filogenética entre as duas alternativas utilizadas nessa investigação.

3.2. Pitiose

A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa que atinge: equinos provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo; caninos e felinos com apresentação gastrointestinal e cutânea; bovinos e ovinos com doença cutânea; e humanos apresenta-se nas formas cutânea, subcutânea, ocular e sistêmica (SANTURIO et al., 2006). Existe também o relato desta doença em outras espécies como aves (PESAVENTO et al., 2008), urso (GROOTERS, 2003), jaguar (CAMUS et al., 2004), camelo (WELLEHAN et al., 2004) e trigre (BUERGELT et al., 2006). Epidemiologicamente, a pitiose está relacionada com o contato dos animais e humanos com águas contaminadas pelo agente, onde o mesmo produz

zoósporos móveis que se constituem na forma infectante do *P. insidiosum* (MENDOZA et al., 1996). A enfermidade é prevalente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (MEIRELES et al., 1993; MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 1998), tendo sido relatada na Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Estados Unidos, Haiti, Índia, Indonésia, Japão, Nova Zelândia, Papua-Nova Guiné, Tailândia (MENDOZA et al., 1996), Venezuela (PEREZ et al., 2005) e África (RIVIERRE et al., 2005).

No Brasil, a pitiose foi descrita em humanos, equinos, bovinos e caninos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas de equinos. A primeira descrição da enfermidade na espécie equina foi realizado por SANTOS & LONDERO (1974), ao avaliarem a histopatologia de lesões tumorais do tecido subcutâneo de equinos no Rio Grande do Sul. Desde então, várias descrições da doença em diferentes Estados do Brasil, incluindo Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará e Paraíba, comprovam a existência da pitiose equina em todo o país (CARVALHO et al., 1984; SANTOS et al., 1987; MEIRELES et al., 1993; MORAL et al., 1997; TÚRY & COROA, 1997; MONTEIRO, 1999; TABOSA et al., 1999; SANAVRIA et al., 2000; LEAL et al., 2001a; REIS et al., 2003; SALLIS et al., 2003; HEADLEY & ARRUDA, 2004). Embora não exista um levantamento preciso da incidência no Brasil, a pitiose equina representa um problema à equideocultura, especialmente em regiões alagadiças como o Pantanal (LEAL et al., 2001b). As condições ambientais são fatores de maior influência para o desenvolvimento do *P. insidiosum*. O organismo requer um ambiente aquático, além de temperaturas em torno de 30°C e 40°C para a sua reprodução. Chuvas intensas e prolongadas que ocorrem nos meses de verão mantêm o meio necessário para o desenvolvimento do agente e a ocorrência de inundações pode ajudar a distribuir o organismo sobre uma área mais ampla (MILLER & CAMPBELL, 1982b).

Na espécie equina a pitiose é conhecida por outros nomes como hifomicose, zigomicose, dermatite granular, “*bursattee*”, “*Florida leeches*”, granuloma ficomicótico, “*swamp cancer*” (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996) e “ferida da moda” (LEAL et al., 2001a). As lesões cutâneas são as mais frequentes e atingem principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toraco-abdominal, provavelmente devido ao maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos (MILLER & CAMPBELL, 1982b; CHAFFIN et al., 1995). Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas e granulomatosas, formando grandes massas teciduais (5 a 500 mm), com bordas irregulares, de aparência tumoral e com hifas recobertas por células necróticas, que formam massas branco-amareladas semelhantes a corais, os “*kunkers*” (MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES

et al., 1993; SANTURIO et al., 2006). Conforme estes autores, os “*kunkers*” variam de 2 a 10 mm de diâmetro, têm forma irregular e aspecto arenoso, são ramificadas e penetram no tecido granular dentro de *sinus* formados ao longo do seu trajeto. Os animais apresentam intenso prurido e normalmente mutilam a lesão na tentativa de aliviar o desconforto (LEAL et al., 2001a).

A segunda forma mais frequente de infecção em equinos é a intestinal, caracterizando-se por massas teciduais localizadas na parede do intestino, levando à diminuição e à obstrução do lúmen (SANTURIO et al., 2003b). A maioria dos casos descritos relata episódios de cólica, cuja causa é a presença de massas teciduais, com diminuição e obstrução do lúmen intestinal ou ambos, frequentemente apenas uma lesão é encontrada em cada animal, porém podem existir lesões multifocais (MENDOZA & ALFARO, 1986; CHAFFIN et al., 1992). Além disso, pode ocorrer disseminação para órgãos internos a partir de infecções subcutâneas (REIS et al., 2003), como nos casos descritos de lesões ósseas (MENDOZA & PRENDAS, 1988; ALFARO & MENDOZA, 1990; EATON, 1993). Estes estudos referem-se à equinos com lesões cutâneas crônicas, localizadas nos membros e com grande proliferação de tecido granulomatoso, onde as lesões ósseas ficaram limitadas aos ossos adjacentes às lesões cutâneas.

Casos de metástases via sistema linfático para pulmões e linfonodos regionais já foram relatados (CHAFFIN et al., 1995). Foram descritos casos nos linfonodos cervicais inferiores, inguinais e submandibulares (CONNOLE, 1973; MURRAY et al., 1978; LEAL et al., 1997), sendo sempre os responsáveis pela drenagem linfática da região atingida pela lesão cutânea. Os linfonodos atingidos apresentavam “*kunkers*”, dos quais foi possível o isolamento do agente etiológico. Na maioria dos casos de pitiose cutânea, os linfonodos regionais encontram-se aumentados. No entanto, esse achado pode ser utilizado apenas como um indicativo de metástase.

Os caninos são a segunda espécie mais atingida pela pitiose, também nas formas cutânea e gastrointestinal (SANTURIO et al., 2006). A forma gastrointestinal é a mais comum e manifesta-se com distúrbios digestivos como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia (às vezes sanguinolenta) e presença de massas nodulares, quando submetidos à palpação abdominal (SMITH et al., 1989; FISCHER et al., 1994; DYKSTRA et al., 1999; GROOTERS, 2003; RODRIGUES et al., 2006). Os cães afetados são normalmente oriundos de regiões rurais ou estiveram, esporadicamente, em locais alagados como açudes e banhados (FOIL et al., 1984; FISCHER et al., 1994; DYKSTRA et al., 1999). As lesões cutâneas apresentam-se como dermatites piogranulomatosas ulcerativas, contendo áreas de necrose

infiltradas por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinófilos (ENGLISH & FROST, 1984; FOIL et al., 1984; DYKSTRA et al., 1999).

A pitiose em felinos é rara havendo poucos relatos na literatura. Um deles refere-se a uma infecção nasal e retrobulbar, sem envolvimento de órgãos internos, cujo diagnóstico baseou-se em imunohistoquímica, sorologia através de imunodifusão e isolamento do agente (BISSONNETTE et al., 1991). No outro relato, foram dois casos de pitiose gastrointestinal em gatos nos EUA (RAKICH et al., 2005). Foram descritos os primeiros casos de pitiose em mamíferos não domésticos: urso apresentando forma cutânea e gastrointestinal (GROOTERS, 2003), jaguar (*Panthera onca*) com pitiose pulmonar da América Central (CAMUS et al., 2004) e um tigre (*Panthera tigris tigris*) com lesão intestinal (BUERGELT et al., 2006).

A pitiose bovina também é pouco frequente, geralmente acometendo os membros dos animais. As lesões nesta espécie são caracterizadas especialmente por ulcerações, espessamento da derme e edema na região afetada. Surtos foram relatados no continente americano, primeiramente na região de Louisiana, EUA (MILLER et al., 1985), e posteriormente no Brasil (SANTURIO et al., 1998) e na Venezuela (PEREZ et al., 2005). Os casos observados no Brasil apresentaram cura espontânea das lesões (SANTURIO et al., 1998). Já em ovinos essa doença é rara, tendo seu primeiro surto descrito no Brasil (TABOSA et al., 2004), onde os animais afetados apresentaram feridas com lesões ulcerativas nas patas e também nas regiões pré-escapular e abdominal. O segundo relato de pitiose em ovinos também foi relatado no Brasil, e foi o primeiro caso de rinite granulomatosa por *P. insidiosum* descrito nesta espécie (SANTURIO et al., 2008). A enfermidade ocorreu em quatro ovinos da raça Santa Inês e foi caracterizada por nodulações e necrose nasal, dificuldade respiratória e epistaxe intermitente (SANTURIO et al., 2008).

A pitiose humana foi documentada pela primeira vez em 1985 (DE COCK et al., 1987). Desde então, muitos casos têm sido relatados, com altas taxas de morbidade e mortalidade (PUPAIBOOL et al., 2006). É comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, e dois fatores contribuem para a importância da pitiose nesse país: a prevalência de β -talassemia e presença de grandes áreas alagadas usadas para agricultura (TRISCOTT et al., 1993). As infecções por *P. insidiosum* em humanos podem apresentar-se de três formas: lesões granulomatosas no tecido subcutâneo de pacientes talassêmicos; forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmicos; e queratite, podendo ou não estar associada à talassemia (IMWIDTHAYA, 1994b). No Brasil, a pitiose teve seu primeiro relato em humanos no ano de 2005, na forma cutânea (BOSCO et al.,

2005). O caso mais recente de pitiose humana foi relatado, no início deste ano, na Tailândia, onde um menino de 10 anos portador de β -talassemia apresentou úlcera gangrenosa e claudicação. Após o diagnóstico de pitiose o tratamento foi iniciado a base de terbinafina e itraconazol combinado com imunoterapia, obtendo-se sucesso (SUDJARITRUK & SIRISANTHANA, 2011).

3.2.1. Diagnóstico

O diagnóstico da pitiose, tradicionalmente, é feito pelos aspectos clínicos, histopatológicos e pelo isolamento e identificação do agente através de suas características culturais, morfológicas e reprodutivas. O exame histopatológico é auxiliar no diagnóstico e necessita de outras provas para confirmação (SANTURIO et al., 2006b). A identificação precoce da doença, no entanto, torna-se difícil através desses métodos (SANTURIO et al., 2006a). Atualmente, métodos como imunohistoquímica, técnicas de biologia molecular e provas sorológicas auxiliam e suportam um diagnóstico precoce e correto (MENDOZA et al., 1996). O sucesso no isolamento de *P. insidiosum* é alto quando amostras de biópsias são armazenadas ou transportadas à temperatura ambiente, com o acréscimo de antibióticos, entre um e três dias antes de seu processamento no laboratório (SANTURIO et al., 2006a). O diagnóstico imunológico, pela técnica de ELISA, possibilita a detecção de infecções precoces ou ainda subclínicas (MENDOZA et al., 1997). Além de constituir-se numa poderosa ferramenta para o diagnóstico específico, também pode ser útil no monitoramento da resposta à terapia (GROOTERS, 2003). Testes de ELISA para detecção de pitiose em equinos, caninos, felinos, humanos e bovinos já foram desenvolvidos para diagnóstico precoce (GROOTERS & GEE, 2002; PEREZ et al., 2005; SANTURIO et al., 2006b). Embora as técnicas moleculares ainda não estejam disponíveis em grande escala, constituem importante ferramenta para o diagnóstico e identificação de *P. insidiosum*, principalmente através da técnica de PCR (GROOTERS & GEE, 2002; JAEGER et al., 2002; REIS et al., 2003; BOSCO et al., 2005; MENDONZA & NEWTON, 2005; RIVIERRE et al., 2005).

3.2.2. Tratamento

O tratamento da pitiose é influenciado principalmente pelo tamanho e evolução clínica da lesão, idade e estado nutricional do animal (MONTEIRO, 1999). Além de ampla

excisão cirúrgica, a imunoterapia e agentes antifúngicos têm sido utilizados com algum sucesso no tratamento de pitiose. Independente da terapia escolhida, é de extrema importância que o tratamento seja iniciado o mais breve possível. A cirurgia radical, inclusive amputação, ainda é o tratamento mais utilizado e eficaz desta infecção em humanos e animais (McMULLAN et al., 1977; MENDOZA & ALFARO, 1986; THOMAS LEWIS, 1998; KRAJAEJUN et al., 2006). A intervenção cirúrgica é complicada devido às estruturas anatômicas envolvidas, pois a partir da permanência de fragmentos do agente podem ocorrer recidivas (MILLER, 1981; CHAFFIN et al., 1995). O tratamento cirúrgico apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais, onde seja possível a retirada de toda área afetada (SANTURIO et al., 2006a).

O tratamento quimioterápico das infecções causadas por *P. insidiosum* em animais e humanos é complicado pelas características singulares do agente, que difere dos fungos verdadeiros na produção de zoósporos móveis e na composição de sua parede celular. Os fungos verdadeiros possuem quitina, em sua parede, enquanto *P. insidiosum* contém celulose e β -glucanos. A membrana plasmática não contém esteroides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas (FOIL, 1996). Devido a essas características, as drogas antifúngicas tradicionais são ineficientes para o tratamento da pitiose (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989; FOIL, 1996).

Os agentes que interferem na biossíntese de ergosterol como os azóis (cetoconazol, itraconazol, miconazol, fluconazol, etc) terbinafina e anfotericina B, alteram a permeabilidade da membrana celular, causando lise celular de fungos e, portanto, têm pouco efeito sobre *P. insidiosum*. Apesar dessa desvantagem, há relatos clínicos de sucesso com o uso destas drogas (BISSONNETTE et al., 1991; TRISCOTT, et al., 1993; SHENEP et al. 1998; GROOTERS, 2003). Vários relatos sobre a sensibilidade de *P. insidiosum* frente à inibidores da biossíntese do ergosterol e caspofungina (um inibidor da síntese de β -glucano (DERESINSKI & STEVENS, 2003) têm sido publicado recentemente (GROOTERS, 2003; PEREIRA et al., 2007, 2008; ARGENTA et al., 2008; BROWN et al., 2008, CAVALHEIRO et al., 2009a, 2009b; ARGENTA et al., 2010).

A caspofungina, testada em um modelo experimental *in vivo* como coelhos, gera uma redução no crescimento das lesões destes animais tratados, mas quando a terapia é encerrada recomeça o crescimento das lesões (PEREIRA et al., 2007). Combinações de terbinafina e itraconazol ou terbinafina e voriconazol apresentaram melhor desempenho contra isolados de *P. Insidiosum*, do que cada agente individualmente (ARGENTA et al., 2008). Uma observação também feita por combinações de terbinafina com: fluconazol, caspofungina ou

anfotericina B , reduziu significativamente a concentração inibitória mínima (CIM) destes fármacos quando comparado às CIM destes mesmos fármacos utilizados separadamente (CAVALHEIRO et al., 2009a, 2009b). Relatos demonstrando estudos *in vitro* utilizando antibióticos como os macrolídeos e a tetraciclina demonstram novas alternativas para o tratamento de pitiose. Além da farmacologia conhecida e segurança destes antibióticos é importante considerar estas novas opções terapêuticas para testes em modelos animais da doença, isoladamente ou em combinação com outras drogas (LORETO et al., 2011). Um agente antimicótico que aguarda estudo mais aprofundado da sua utilidade contra a infecção por *P. insidiosum* é o composto fenilamida mefenoxame, um inibidor de RNA polimerase que tem sido utilizado contra oomicetos fitopatogênicos (BROWN et al., 2008). Os testes de novos antimicóticos e medicamentos em animais são muitas vezes dificultados pelos custos envolvidos.

3.2.1.1 Imunoterapia

A imunoterapia surgiu como uma alternativa para o tratamento da pitiose equina quando MILLER (1981) desenvolveu um imunoterápico a partir de culturas do próprio agente (hifas sonicadas). O índice de eficiência obtido na imunoterapia foi entre 53 e 75% quando associado à cirurgia (MILLER, 1981; MILLER & CAMPBELL, 1982a).

Baseados em técnicas originalmente descritas, MENDOZA & ALFARO (1986) utilizaram o antígeno obtido do sobrenadante de culturas de *P.insidiosum* com o objetivo de diminuir a reação no local de aplicação e induziu, desta forma, a recuperação de três animais entre os cinco tratados. MENDOZA et al. (1992) compararam duas vacinas para o tratamento da pitiose equina em 71 cavalos infectados. Uma vacina utilizou massa celular como antígeno e a outra um antígeno solúvel concentrado. As duas vacinas apresentaram resultado positivo em cavalos com lesões com menos de dois meses, com 60% e 70% de eficiência, respectivamente.

No Brasil, o teste de eficiência de um imunoterápico para o tratamento da pitiose equina, produzido a partir de culturas de *P. insidiosum*, baseando-se na metodologia anteriormente descrita por MILLER (1981), demonstrou índice de cura de 50% a 83,3% entre os grupos tratados (MONTEIRO, 1999). A inovação deste imunoterápico em relação aos outros protocolos de vacinas descritos por MILLER (1981) e MENDOZA et al., (1992) está na liofilização do imunoterápico com prazo de validade acima de 1 ano, além do processo de liberação de antígenos ocorrer a partir da massa micelial macerada ou liquidificada. Na

produção do imunoterápico PITIUM-VAC[®] (LAPEMI/UFSM¹) utiliza-se um cultivo de *P. insidiosum* isolado a partir de um potro com pitiose clínica no município de Jaguari, RS, Brasil, confirmado e registrado (CBS, Holanda²) sob o número CBS 101555. Este isolado (CBS 101555) foi utilizado por SHURKO et al., (2003b) para estudar as diferenças moleculares entre cepas de *P. insidiosum* originárias da Ásia, Austrália e Américas. Neste estudo o isolado CBS 101555 mostrou o mesmo perfil molecular de isolados de equinos da Costa Rica e Estados Unidos (SANTURIO, 2004).

Nos seres humanos, a imunoterapia foi usada com sucesso em 1998, em um menino tailandês que tinha a infecção por *P. insidiosum* vascular onde a cirurgia e terapia antimicótica não funcionaram de forma adequada. O paciente curou-se após receber duas aplicações (100µl) com intervalo de 14 dias (THITITHANYANONT et al., 1998). Em um estudo clínico em pessoas que sofrem da forma vascular de pitiose, a imunoterapia foi usada como último recurso (WANACHIWANAWIN et al., 2004). Após duas administrações da vacina com duas semanas do intervalo, quatro pacientes reagiram positivamente à vacina, dois pacientes moderadamente e dois pacientes não apresentaram resposta. Os dois últimos pacientes faleceram dentro de um curto período de tempo. Supõe-se que o sucesso dessa terapia seja melhor se for aplicada assim que a doença é diagnosticada. As chances de cura diminuem, especialmente quando as lesões apareceram há mais de dois meses (WANACHIWANAWIN et al., 2004).

O completo conhecimento dos mecanismos envolvidos nas infecções por *P. insidiosum* ainda não foi completamente esclarecido, devido, em parte, às diferenças entre *P. insidiosum* e outros fungos que são patogênicos para os mamíferos. De acordo com MILLER (1981), o caráter progressivo da doença em equinos imunocompetentes sugere uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio na resposta imunológica. O possível mecanismo imunológico desencadeado na pitiose equina foi proposto por MENDOZA et al., (1996), acreditando que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia baseiam-se principalmente na resposta celular. Este fato é sustentado pelas alterações teciduais após o início da imunoterapia, com mudança de inflamação eosinofílica inicial para uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T ao final da resposta. É provável que os antígenos presentes no imunógeno induzam esta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais.

¹ Laboratório de Pesquisas Micológicas/Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, RS, Brasil e Embrapa Pantanal.

²Centraalbureau voor Schimmelcultures/Holanda.

3.3. Análise Molecular

3.3.1. Filogenia Molecular

O conhecimento da evolução de que todos os seres vivos compartilham um ancestral comum e que a estrutura dos organismos traz armazenada em si parte da sua história evolutiva, tem estimulado o estudo das relações de parentesco entre os organismos. Desta forma, quando buscamos descobrir a existência de conexões entre as espécies, ou seja, a existência de uma filogenia, devemos considerar que tanto as espécies quanto suas características são conectadas historicamente. Assim, poderíamos definir como filogenia uma suposta reconstrução da história evolutiva de um grupo, indicando os níveis de ancestralidade das espécies com suas espécies descendentes (AMORIM, 2002).

Os estudos filogenéticos das espécies consideram as relações de parentesco e a história evolutiva, sob a premissa de que as espécies mais próximas compartilham um maior número de características em comum do que as mais distantes. A filogenia representa uma hipótese das relações de ancestralidade comum entre táxons ou grupos, compreendida a partir de caracteres morfológicos, fisiológicos e moleculares, entre outros. Enfim, por meio de uma análise filogenética, podê-se compreender os processos evolutivos tais como a extinção e a adaptação, e dessa forma inferir a história da evolução (MIYAKI et al., 2001).

Para realizar estudos filogenéticos é preciso utilizar informações de dois grupos, primeiro os dados do grupo que será analisado, ou seja, o grupo interno. Essas informações serão comparadas aos dados de um segundo grupo, denominado de grupo externo; isto é, são os táxons que não se encontram nem dentro do grupo analisado, e nem tão distante filogeneticamente desse e são selecionados com o intuito de polarizar (enraizar) a árvore filogenética para definir se os estados de caracteres são plesiomórficos ou apomórficos (ARRIEL et al., 2006).

A idéia de usar dados moleculares na inferência filogenética surgiu com ZUCKERKANDL & PAULING (1965). Estes autores sugeriram que as mudanças moleculares, em nível de substituições de aminoácidos ou de nucleotídeos ocorrem em uma taxa proporcional ao relógio molecular; isto é, indicam a velocidade em que os aminoácidos ou nucleotídeos homólogos divergem a partir de um ancestral comum. Essas mudanças podem seguir modelos simples, em que as transições ocorrem com a mesma probabilidade que as demais substituições nucleotídicas ou a modelos mais complexos, que podem calcular

diferentes probabilidades para cada substituição e considera estas taxas como sendo simétricas (SOLTIS et al., 1992).

O estudo sobre as relações evolucionárias entre os organismos vem aumentando, devido aos avanços das técnicas moleculares e à disseminação das teorias filogenéticas, que usam como base de dados moleculares as sequências de DNA, RNA e proteínas. A quantidade de informação fornecida pelas proteínas e pelo DNA é vasta para os estudos filogenéticos, pois cada par de bases em uma sequência de nucleotídeo ou cada aminoácido de uma proteína é analisado e considerado um caráter separado (ARRIEL et al., 2006).

3.3.2. Genoma Nuclear e Mitocondrial: Marcadores Filogenéticos.

Nos eucariotos, as sequências de DNA podem ser obtidas a partir de genes como o DNA nuclear (nDNA) e o DNA mitocondrial (mtDNA). As variações que ocorrem nesses genes, tais como mutações e rearranjos, incluindo inversões, deleções e inserções, são os caracteres utilizados na análise filogenética. A combinação das variações entre esses genes é uma das melhores ferramentas para a reconstrução filogenética de um táxon, permitindo uma maior confiança nos resultados (QIU et al., 1999).

A mitocôndria é uma organela que possui herança unipariental. Contudo, o mtDNA é pouco conhecido, sabe-se, entretanto, que o seu tamanho, configuração e ordem gênica mudam rapidamente, enquanto a sequência primária do genoma possui taxa de evolução lenta. No genoma dessa organela os rearranjos são tão frequentes que um mesmo indivíduo pode ter diferentes cópias (PALMER, 1992).

O genoma nuclear é organizado em cromossomos, possui alta taxa de complexidade e é mais conservado que o mtDNA. Contudo, um gene nuclear muito utilizado na inferência filogenética é o 18S, que é um dos constituintes do DNA ribossomal (rDNA) (SOLTIS et al., 2000). O DNA ribossomal (rDNA) é a região do genoma que codifica os componentes do RNA dos ribossomos (rRNA). O rDNA é constituído por três exons: 18S, 26S e 5.8S, que codificam rDNA e as unidades do rRNA e dois espaçadores (ITS1 e ITS2). Em geral, as regiões codificadoras de rDNA evoluem lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em níveis hierárquicos mais elevados. Já os introns, conhecidos como espaçadores internos transcritos (ITS) evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, o que os tornam importantes nos estudos filogenéticos de gêneros e entre algumas espécies (BALDWIN et al., 1995).

Desta forma, o uso de marcadores genéticos das regiões mitocondriais e nucleares são ferramentas muito importantes nos estudos de variabilidade genética e no estabelecimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies.

3.3.3. Métodos de Reconstrução Filogenética

A reconstrução filogenética estima as relações de ancestralidade existentes em um determinado número de organismos pela construção de uma árvore filogenética, que representa a história evolutiva dos táxons nela presentes. Esses táxons podem ser: famílias, gêneros, espécies, populações, ou qualquer grupo taxonômico que se deseja inferir dados sobre a sua história evolutiva (ARRIEL et al., 2006). Os métodos de reconstrução de árvores filogenéticas baseiam-se em duas metodologias principais: fenéticas e cladísticas.

As análises fenéticas utilizam medidas de distância ou de similaridade genética, que mostram as diferenças entre os caracteres em números, temos como modelo deste método de reconstrução o agrupamento de vizinhos ou Neighbor-Joining (NJ). Uma matriz de distância entre todos os possíveis pares do grupo de estudo é criada, e as árvores são desenvolvidas agrupando os indivíduos com menor diferença em um fenograma. Entre os princípios que guiam a taxonomia numérica, alguns são: a melhor classificação usualmente resulta de análises baseadas em um grande número de caracteres; onde todo caracter tem o mesmo peso; as classificações são baseadas em medidas quantitativas de similaridade ou distância entre os táxons e os padrões de correlação entre caracteres podem ser usados para reconhecimento de um táxon distinto (AVISE, 2004).

A análise NJ é um método simples de evolução mínima o qual se baseia no cálculo das distâncias evolutivas para todos os indivíduos e reconstrução de uma árvore que leva em consideração as relações entre todas as distâncias (RUSSO, 2001; SCHENEIDER, 2001). No caso do NJ, a metodologia não busca examinar todas as possíveis topologias, mas aquelas que produzem uma árvore refletindo a organização sequencial de vizinhos e que possam minimizar seu comprimento total (SCHENEIDER, 2001). Trata-se de um método rápido, pois requer menor capacidade computacional, é apropriado para grandes conjuntos de dados, permitindo linhagens com diferentes tamanhos de ramo e substituições múltiplas. No entanto este método demonstra na árvore filogenética apenas uma topologia possível (NEI et al., 1998; NEI & KUMAR, 2000).

As análises cladísticas calculam árvores para cada caracter e indicam a melhor árvore através da determinação daquela que requer menor número de mudanças (máxima parcimônia, MP) ou aquela mais provável estatisticamente (máxima verossimilhança, ML e análise Bayesiana, BA). A idéia básica das análises cladísticas é que os membros do mesmo grupo compartilham uma história evolucionária comum, e são relacionados, mais com membros do mesmo grupo do que com outros organismos. Esses grupos são reconhecidos por compartilharem características únicas que não estão presentes em um ancestral distante (AMORIN, 2002).

A análise MP seleciona árvores filogenéticas que minimizam o comprimento total da árvore ou o número de passos evolucionários necessários para explicar os padrões observados nos dados (SWOFFORD et al., 1996). Como, normalmente, as análises de parcimônia geram mais de uma árvore, deve-se optar por uma árvore de consenso, que representa uma forma conveniente de sumarizar o grau de concordância entre as árvores obtidas em uma análise filogenética. A parcimônia avalia as árvores, escolhendo caminhos que contenham a árvore com menor escore. Durante a busca, diferentes rearranjos podem ser feitos para aumentar a chance de cumprir toda distribuição parcial das árvores (NEI et al., 1998).

A análise ML avalia a hipótese da história evolucionária em termos da probabilidade de que um modelo proposto e a história hipotética originariam um conjunto de dados. A suposição é que a história com maior probabilidade de alcançar o estado observado é preferida em relação à história com menor probabilidade. Este método procura a árvore com maior probabilidade ou mais verossímil possível (FELSENSTEIN, 1981).

Outro tipo de análise para estimar a filogenia, que vem sendo utilizado atualmente, é a BA, que consiste em um método estatístico altamente relacionado com a ML. A hipótese ótima é a que apresenta a máxima probabilidade posterior, que é estimada a partir de um modelo evolutivo previamente selecionado. A probabilidade posterior para uma hipótese é dada pela verossimilhança multiplicada pela probabilidade a priori desta hipótese. Este valor pode ser interpretado como sendo a probabilidade da árvore estar correta (RANNALA & YANG, 1996; HUELSENSBECK et al., 2001).

Sumarizando, a análise cladística busca o número de ramificações existentes entre um grupo de organismos, que conecta um ao outro e a sequência mais próxima dessas ramificações, dando origem a um cladograma. Por outro lado, a análise fenética concentra-se na avaliação do relacionamento genético entre grupos de organismos, com base no grau de similaridade entre eles, originando um fenograma. Acredita-se que a análise cladística seria mais segura que a fenética, já que neste tipo de análise os dados são utilizados na forma em

que são coletados, enquanto na fenética podem-se perder informações nas transformações dos dados, envolvidas na matriz de similaridade (LI & GRAUR, 1991).

4. ARTIGO CIENTÍFICO

CAPÍTULO 1

Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences

ARTIGO 1

Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences

Artigo submetido a *Emerging Infectious Diseases*.

Title: Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum*
based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences

Authors: Maria Isabel de Azevedo^{1*}, Sônia de Avila Botton², Daniela Isabel Brayer Pereira³, Lizandra Jaqueline Robe⁴, Francielli Pantella Kunz de Jesus¹, Camila Donato Mahl¹, Mateus Matiuzzi da Costa⁵, Sydney Hartz Alves¹, Janio Morais Santurio¹

Affiliations: ¹*Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Universitário, Prédio 20, 4139, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.*

²*Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.*

³*Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil .*

⁴*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil*

⁵*Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Petrolina, PE, Brazil.*

***Corresponding author** Tel.: +55 55 32208906

E-mail address: janio.santurio@gmail.com

ABSTRACT

Pythium insidiosum is an aquatic oomycete that is the causative agent of pythiosis. Advances in molecular methods have enabled increased accuracy in the diagnosis of pythiosis, and in studies of the phylogenetic relationships of this oomycete. To evaluate the phylogenetic relationships among isolates of *P. insidiosum* from different regions of Brazil, and also regarding to other American and Thai isolates, in this study it was used a total of thirty isolates of *P. insidiosum* from different regions of Brazil which had their ITS1, 5.8S rRNA and ITS2 rDNA (ITS) region and the partial sequence of cytochrome oxidase II (COX II) gene sequenced and analyzed. The outgroup consisted of six isolates of other *Pythium* species and one of *Lagenidium giganteum*. Phylogenetic analyses of ITS and COX II genes were conducted, both individually and in combination, using four different methods: Maximum parsimony (MP); Neighbor-joining (NJ); Maximum likelihood (ML); and Bayesian analysis (BA). Our data supported *P. insidiosum* as monophyletic in relation to the other *Pythium* species, and COX II showed that *P. insidiosum* appears to be subdivided into three major polytomous groups, whose arrangement provides the Thai isolates as paraphyletic in relation to the Brazilian ones. The molecular analyses performed in this study suggest an evolutionary proximity among all American isolates, including the Brazilian and the Central and North America isolates, which were grouped together in a single entirely polytomous clade. The COX II network results presented signals of a recent expansion for the American isolates, probably originated from an Asian invasion source. Here, COX II showed higher levels bias, although it was the source of higher levels of phylogenetic information when compared to ITS. Nevertheless, the two markers chosen for this study proved to be entirely congruent, at least with respect to phylogenetic relationships between different isolates of *P. insidiosum*.

Key words: *Pythium* spp., phylogenetic analysis, cytochrome c oxidase subunit II, internal transcribed spacer region, oomycete.

INTRODUCTION

Pythium insidiosum is an aquatic oomycete that is the causative agent of pythiosis, a disease that causes inflammation of the skin and subcutaneous tissue and affects mainly horses, dogs and human (1). Pythiosis is endemic in areas with tropical and subtropical climates; such environmental conditions are crucial for the development of the pythiosis-causing organisms in an ecosystem. The production of zoospores requires temperatures between 30 and 40 °C and the accumulation of water in places like swamps and lakes (2). Most cases of human pythiosis are reported in Thailand, and, sporadically, the disease has been reported in Australia, Brazil, Haiti, New Zealand, USA, and other countries (3-5). In humans, the disease has three forms: subcutaneous, ophthalmic and systemic. Systemic pythiosis is associated with hematological disorders such as β as α -thalassemia (6).

Brazil is among the endemic countries for equine pythiosis, and clinical cases have been observed throughout the year, coinciding with the periods of greatest rainfall (7). In horses, pythiosis is characterized by the formation of eosinophilic granulomas, with the presence of necrotic masses referred to as kunkers. The lesions are found especially on the limbs and abdomen of the animals (8-10). Several procedures have been recommended for the treatment of pythiosis: surgical excision, the use of antimicrobial agents and immunotherapy. The success of the therapy is strongly associated with an early diagnosis and with a fast onset of disease treatment (11).

Advances in molecular methods have enabled an earlier and more accurate diagnosis of pythiosis (12-15) and the study of the phylogeny of this oomycete (16-20). In phylogenetic studies, sequences analyses of intergenic transcribed spacer (ITS) of ribosomal RNA (rDNA) has been frequently employed to study the relationships within and among *Pythium* species (21, 22, 16, 20).

Although rDNA is widely used in phylogenetic studies, the evolution of one gene may not represent the evolution of the entire genome (23). Therefore, it is necessary to consider other independent genes and to compare phylogenies derived from these genes. Genes that encode metabolic structural proteins such as cytochrome c oxidase subunit II (COX II) are often used as independent genes in phylogenetic studies (18). COX II is a mitochondrially encoded gene that accumulates mutations throughout evolution, making it useful for the determination of phylogenetic relationships (19, 24).

In the present study the phylogenetic relationships of isolates of *P. insidiosum* from different regions of Brazil were investigated, using the analysis of sequences from the internal transcribed spacer regions 1 and 2 including the intervening 5.8S gene of the ribosomal DNA (ITS) and the partial sequence of cytochrome c oxidase subunit II (COX II) gene. We also assessed the levels of differentiation of the Brazilian isolates among themselves, and of these to other North American and Thai isolates in order to infer their evolutionary history.

MATERIALS AND METHODS

Brazilian isolates of P. insidiosum and DNA extraction

This study used a total of thirty isolates of *P. insidiosum* from different regions of Brazil (Table 1). The isolates were grown in 150 mL of *Sabouraud* broth (2% glucose and 1% peptone) and incubated under agitation (120 RPM) at 37 °C. Mycelia were collected 4 to 7 days later by filtration, washed with sterile water and frozen in liquid nitrogen overnight. Total DNA was isolated according to the protocol described by Moller *et al.* (24) and modified by Klassen *et al.* (25). The DNA concentrations were determined using spectrophotometry.

Table1 List of isolates of *Pythium* and *Lagenidium* species used in this study for internal transcribed spacer regions (ITS) and cytochrome c oxidase subunit II (COX II) DNA coding sequences.

Species	Isolate	Source	Location	Sequence accession number GenBank	
				ITS	COX
<i>P. insidiosum</i>	118	Equine	South /Brazil	JN126280	JN126311
<i>P. insidiosum</i>	119	Equine	South/Brazil	JN126281	JN126312
<i>P. insidiosum</i>	121	Equine	South/Brazil	JN126282	JN126313
<i>P. insidiosum</i>	123	Equine	South/Brazil	JN126283	JN126314
<i>P. insidiosum</i>	124	Equine	Midwest/Brazil	JN126284	JN126315
<i>P. insidiosum</i>	125	Equine	Midwest/Brazil	JN126285	JN126316
<i>P. insidiosum</i>	126	Equine	Midwest/Brazil	JN126286	JN126317
<i>P. insidiosum</i>	129	Equine	Midwest/Brazil	JN126287	JN126318
<i>P. insidiosum</i>	136	Equine	Midwest/Brazil	JN126288	JN126319
<i>P. insidiosum</i>	138	Equine	Midwest/Brazil	JN126289	JN126320
<i>P. insidiosum</i>	143	Equine	Midwest/Brazil	JN126290	JN126321
<i>P. insidiosum</i>	146	Canine	South/Brazil	JN126291	JN126322
<i>P. insidiosum</i>	148	Equine	South/Brazil	JN126292	JN126323
<i>P. insidiosum</i>	156	Equine	South/Brazil	JN126293	JN126324
<i>P. insidiosum</i>	175	Equine	South/Brazil	JN126294	JN126325
<i>P. insidiosum</i>	178	Equine	Midwest/Brazil	JN126295	JN126326
<i>P. insidiosum</i>	187	Equine	South/Brazil	JN126296	JN126327
<i>P. insidiosum</i>	205	Equine	South/Brazil	JN126297	JN126328
<i>P. insidiosum</i>	210	Equine	South/Brazil	JN126298	JN126329
<i>P. insidiosum</i>	219	Equine	South/Brazil	JN126299	JN126330
<i>P. insidiosum</i>	223	Equine	South/Brazil	JN126300	JN126331
<i>P. insidiosum</i>	227	Equine	Midwest/Brazil	JN126301	JN126332
<i>P. insidiosum</i>	232	Equine	South/Brazil	JN126302	JN126333
<i>P. insidiosum</i>	245	Equine	Southeast/Brazil	JN126303	JN126334
<i>P. insidiosum</i>	247	Equine	South/Brazil	JN126304	JN126335
<i>P. insidiosum</i>	258	Equine	South/Brazil	JN126305	JN126336
<i>P. insidiosum</i>	259	Equine	South/Brazil	JN126306	JN126337
<i>P. insidiosum</i>	260	Equine	South/Brazil	JN126307	JN126338
<i>P. insidiosum</i>	261	Equine	South/Brazil	JN126308	JN126339
<i>P. insidiosum</i>	ATCC58637	Equine	Costa Rica	JN126310	JN126340
<i>P. insidiosum</i>	051	Water	South/Brazil	JN126309	JN126341
<i>P. insidiosum</i>	MTPI04	Equine	Texas,/USA	GQ475490 ^a	GQ451571 ^b
<i>P. insidiosum</i>	PC3	Human	Central/ Thailand	GQ260122 ^a	GQ451573 ^b
<i>P. insidiosum</i>	PC5	Human	Central/ Thailand	GQ260120 ^a	GQ451590 ^b
<i>P. insidiosum</i>	PC6	Human	Northeastern/ Thailand	FJ917389 ^a	GQ451574 ^b
<i>P. insidiosum</i>	PC10	Human	Northeastern /Thailand	FJ917395 ^a	GQ451575 ^b
<i>P. insidiosum</i>	PCM1	Human	Northern/ Thailand	FJ917393 ^a	GQ451587 ^b
<i>P. insidiosum</i>	PCM2	Human	Northern/ Thailand	GQ260121 ^a	GQ451591 ^b
<i>P. insidiosum</i>	PEC1	Water	Central/ Thailand	FJ917392 ^a	GQ451576 ^b
<i>P. insidiosum</i>	PECM7	Water	Northern/Thailand	EF016897 ^a	GQ451580 ^b
<i>P. insidiosum</i>	PECM11	Water	Northern/ Thailand	EF016906 ^a	GQ451582 ^b
<i>P. catenulatum</i>	ECU1	Water	Central/ Thailand	FJ917394 ^a	GQ451568 ^b
<i>P. aphanidermatum</i>	P36-3	Bentgrass	Korea	AB095052 ^c	AB095073 ^c
<i>P. deliense</i>	MAFF305568	Pumpkin	Okinawa/ Japan	AJ233442 ^c	DQ071374 ^c
<i>P. graminicola</i>	ATCC96234	Soil	Kumamoto/ Japan	AB095045 ^c	AB160849 ^c
<i>P. irregular</i>	NBRC 100110	Kidney bean	Hokkaido/ Japan	AB107995 ^c	DQ071381 ^c
<i>P. ultimum</i>	NBRC 100122	Sugar beet	Hokkaido/ Japan	D86515 ^c	DQ071398 ^c
<i>L. giganteum</i>	-	Mosquito Larvae	North Carolina/USA	AY151183 ^d	AF086697 ^e

^aSupabandhu J, Fisher MC, Mendoza L, Vanittanakom N. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. *Med Mycol.* 2008;46:41-52.

^bKammarnjesadaku P, Palaga T, Sritunyalucksana K, Mendoza L, Krajaejun T, Vanittanakom N, Tongchusak S, Denduangboripant J, Chindamporns A. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS) *Med Mycol.* 2011;49:289-295.

^cVilla NO, Kageyama K, Suga H. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β-Tubulin gene sequences. *Mycologia.* 2006;93:410-422.

^dSchurko AM, Mendoza L, Levesque CA, et al. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycol Res.* 2003;107:53-544.

^eHudspeth D, Nadler S, Hudspeth M. A COX2 molecular phylogeny of the *Peronosporomycetes*. *Mycologia.* 2000;92:67-684.

Amplification of specific segments of DNA and sequencing

The amplification of the chosen genetic markers was performed by polymerase chain reaction (PCR), through the use of the universal primers ITS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') and ITS4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') (27) for ITS, and FM58 (5'-CCACAAATTTCACTACATTGA-3') and FM66 (5'-TAGGATTTCAAGATCCTGC - 3') (28) for COX II. All reactions were carried out in a total volume of 50 µl, containing 20 pmol of each primer, 1.25 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen), 200 µM of deoxynucleotides, 1X of the 10X enzyme buffer, 1.5 mM MgCl₂, and 200 ng of DNA sample. The amplifications were performed using PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research) with the following cycling profile: 94 °C / 5 min, 30 cycles of 94 °C / 1 min, 55 °C / 1min (ITS) or 52 °C / 1min (COX II), 72 °C / 2 min, and finishing with 72 °C / 10min. *P. insidiosum* isolate CBS 101555 was used as a positive control. PCR products were separated on a 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. After the products were purified with the PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen) and sequenced in an automated sequencer (MegaBACE500) using the DYEnamic ET Kit (Amersham) and the same primers used to the PCR reactions.

Phylogenetic Analysis

The chromatograms obtained were viewed and assembled using the Gap4 program of the Staden package software (29). In addition to the 30 sequences obtained for each genetic marker from all Brazilian isolates of *P. insidiosum*, nine sequences of isolates from Thailand, one from Costa Rica and one from Texas (U.S.) were added to each of the two matrices. The outgroup consisted of six isolates of other *Pythium* species (*P. aphanidermatum*, *P. catenulatum*, *P. deliense*, *P. graminicola*, *P. irregularity* and *P. ultimum*) and one of *Lagenidium giganteum*. All isolate sequences used in this study are available in GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) and are listed in Table 1. The multiple alignments of the two data sets were conducted using the Clustal W algorithm in the MEGA 5 software (30).

Phylogenetic analyses for ITS and COX II were conducted, both individually and in combination, using four different methods: 1 analysis of Maximum Parsimony (MP) performed in PAUP 4.0b10 (31); 2 Neighbor-joining analysis (NJ), also performed in PAUP 4.0b10; 3 analysis of Maximum Likelihood (ML), conducted in PhyML 2.4.4 (32); and 4 Bayesian analysis (BA), carried out in MrBayes 3.1.2 (33). The ML and NJ, evolutionary models, were obtained using the models suggested by the Akaike Information Criterion (AIC test) (34) performed in ModelTest 3.7 (35) in conjunction with PAUP 4.0b10. The BA evolutionary model was created following the model suggested by the AIC test as applied by MrModelTest 2.2.1 (36) in conjunction with PAUP 4.0b10. The analyses of MP were obtained through a process of homogeneous weighing with gaps being treated as a new state. These MP analyses were performed using a heuristic search with Tree Bisection-Reconnection rearrangements (TBR) applied to the initial trees generated by 100 replicates of random stepwise addition of OTUs (Operational Taxonomic Units). For the BA analyses, Markov Chain Monte Carlo (MCMC) was performed by 40,000,000 generations. Sampling was achieved every 1,000 generations and using two runs of four chains, with a burn-in rate of 25% for the early generations. In the BA model, the numbers that support each node represent the posterior probability (PP) of each clade. In the MP, NJ and ML models, the support of each node is based on 1,000 bootstrap replicates (BO).

COX II haplotype networks were additionally constructed in Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com) using the Median-joining method (37). Moreover, DNAsp 5 software (38) was used to measure the nucleotide diversity levels.

RESULTS

The DNA sequences of all Brazilian isolates of *P. insidiosum*, used in this study, obtained from sequencing are available in GenBank (Table 1), and the matrices analyzed were 49 x 470 and 49 x 594 for COX II and ITS, respectively. The empirical and estimated molecular evolution properties obtained for each of these markers, as well as their optimal substitution models are listed in Table 2, which demonstrates that, in general, COX II showed higher levels of compositional and substitutional biases, leading to the adoption of more complex evolutionary models. However, in both models considered, it was necessary to correct for heterogeneity in substitution rates among sites, which was accomplished using a gamma correction.

The phylogenetic trees obtained using BA methods of phylogenetic analysis with the matrices are shown in Figure 1 (COX II), Figure 2 (ITS) and Figure 3 (both concatenated markers). The bootstrap values obtained for each of the clades presented in these phylogenies according to the analysis of MP, NJ and ML are shown in Table 3. Only groups in agreement on both the individual analysis, that presented support in the concatenated analysis (PP = 0.95 and / or BO = 70), are accepted as a plausible evidence of the evolutionary relationships.

Table 2 Properties of each of the analyses used molecular datasets.

	COX II	ITS	Combined
N° of positions in the alignment	470	594	1064
N° of OTUs	49	49	49
N° of variable sites	121	218	339
N° of parsimoniously informative sites	81	140	221
Average nucleotide frequencies ^a			
- A	32.1	21.2	26.2
- C	11.6	19.6	16.0
- G	16.5	27.8	22.7
- T	39.9	31.4	35.2
Transition/Transversion ratio ^a	0.48	1.10	0.79
MrModelTest AIC test best fit model	GTR + G	HKY + G	GTR + G for COX II; HKY + G for ITS
ModelTest AIC test best fit model	GTR + G	HKY + G	TVM + I + G
Proportion of invariable sites	-	-	0.4395
Gamma distribution shape parameter ^b	0.1982	0.3476	1.0520
Rate matrix ^b			
- rAC	1.6613	-	0.8037
- rAG	4.1132	-	2.6639
- rAT	6.2657	-	1.9592
- rCG	0.6628	-	1.0235
- rCT	6.6255	-	2.6639
Ti/Tv Ratio	-	1.2814	-

^a Empirical values as obtained by Mega 3.1 program. ^bMaximum likelihood settings from the best fit model selected by AIC in ModelTest 3.7.

Abbreviations: GTR, General Time Reversible (Rodriguez et al. 1990); HKY, Hasegawa-Kishino-Yano model (Hasegawa et al. 1985); TVM, transversional model; I, proportion of invariable sites; G, shape parameter of gamma distribution.

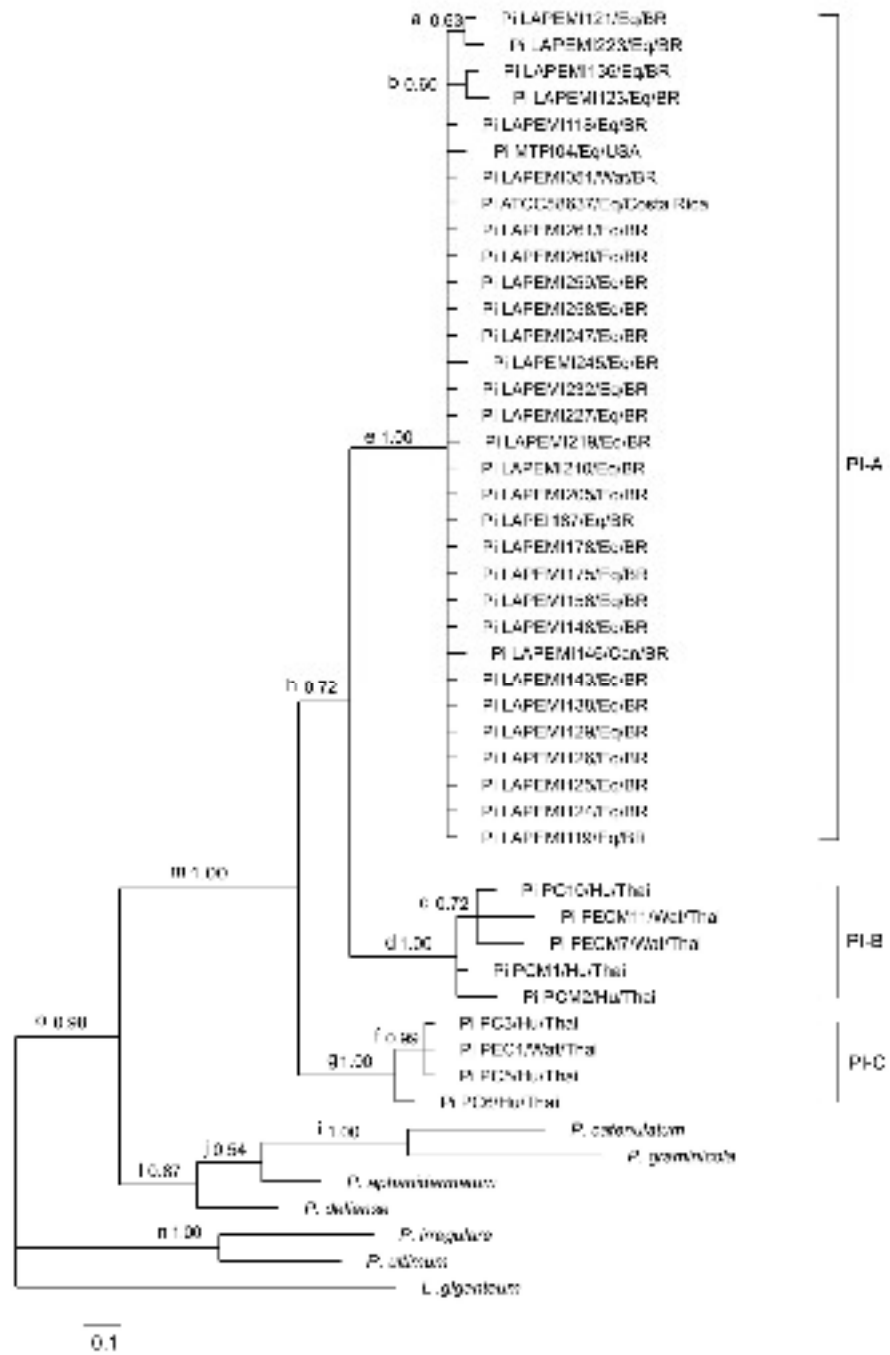


Figure 1 Bayesian analysis (BA) majority-rule consensus tree based on cytochrome oxidase II (COX II) sequences. The posterior probability of each clade is indicated beside its respective internal node. At the front of the internal branches there is an arbitrarily defined letter representing the clade that follows and which can be used to interpret Table 3.

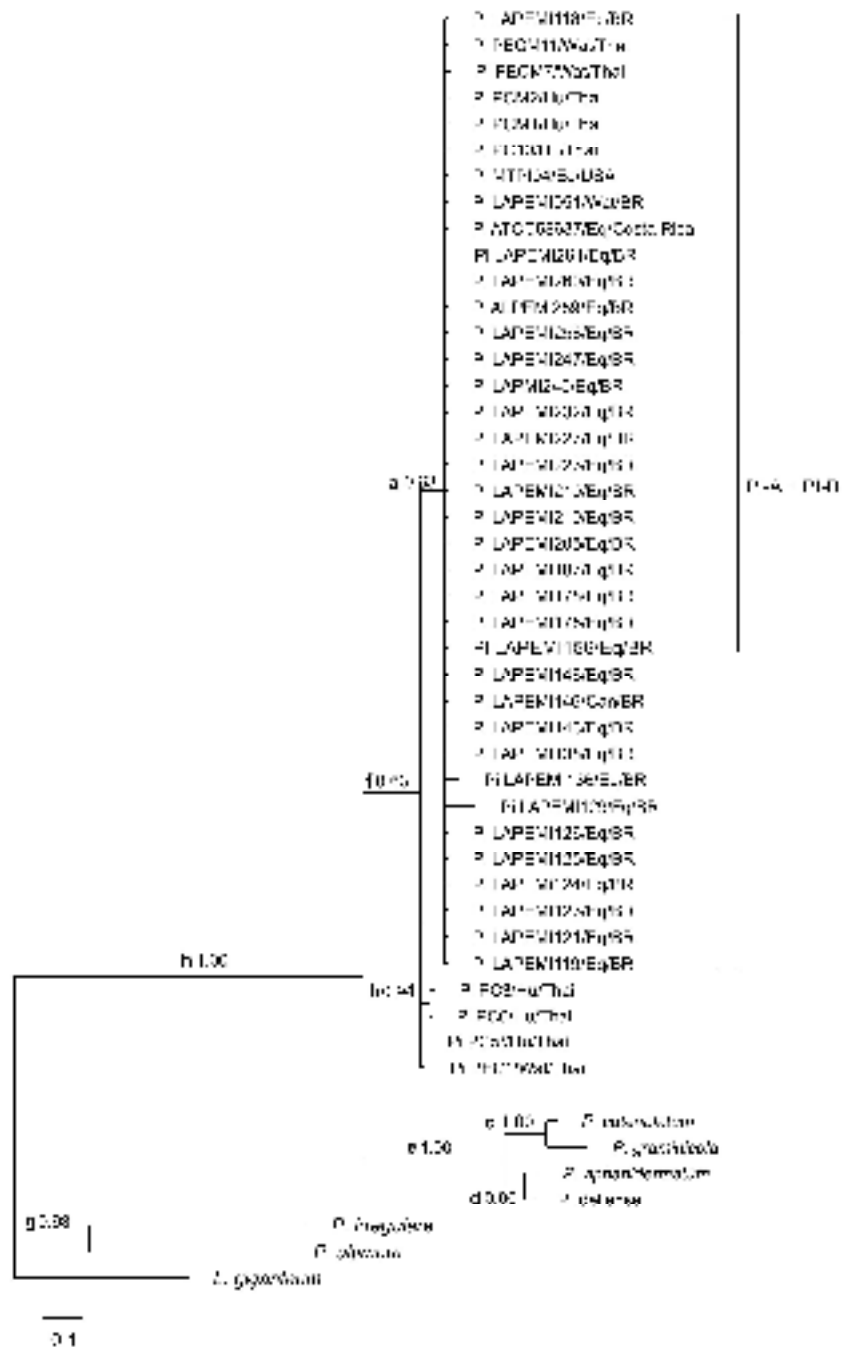


Figure 2 Bayesian analysis (BA) majority-rule consensus tree based on rDNA ITS region sequences. The posterior probability of each clade is indicated beside its respective internal node. At the front of the internal branches there is an arbitrarily defined letter representing the clade that follows and which can be used to interpret Table 3.

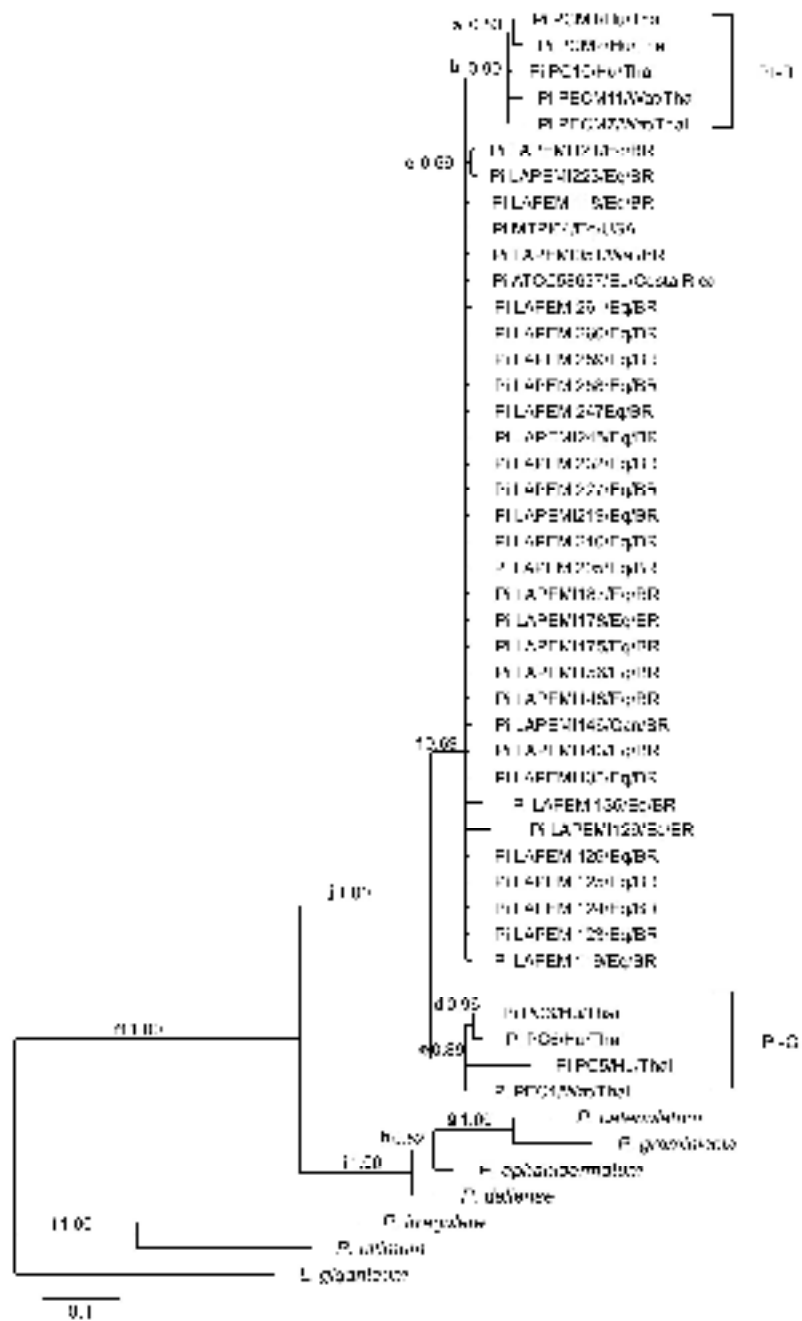


Figure 3 Bayesian analysis (BA) majority-rule consensus tree based on matrix containing *ITS + COX II*. The posterior probability of each clade is indicated beside its respective internal node. At the front of the internal branches there is an arbitrarily defined letter representing the clade that follows and which can be used to interpret Table 3.

Table 3 Bootstrap values presented for each of the clades shown in Fig.1, Fig. 2 and Fig. 3 by the trees constructed using different phylogenetic reconstruction methods.

Clade	<i>Phylogenetic reconstruction method</i>				
	BA ¹	MP ²	NJ ³	ML ⁴	
COXII	a	0,63	-	58	-
	b	0,60	-	63	-
	c	0,72	-	-	55
	d	1,00	97	100	97
	e	1,00	100	100	100
	f	0,99	86	88	96
	g	1,00	100	100	100
	h	0,72	69	54	51
	i	1,00	93	91	95
	j	0,54	-	-	40
	l	0,87	75	51	57
	m	1,00	99	100	99
	n	1,00	98	98	100
	o	0,98	100	83	82
ITS	a	0,63	69	65	-
	b	0,94	93	92	93
	c	1,00	90	98	97
	d	0,86	85	98	75
	e	1,00	100	100	100
	f	0,63	100	51	93
	g	0,98	92	84	92
	h	1,00	100	100	100
CA*	a	0,83	-	80	61
	b	0,90	99	99	100
	c	0,69	-	62	45
	d	0,96	61	69	57
	e	0,89	100	99	96
	f	0,69	71	98	84
	g	1,00	100	100	100
	h	0,52	-	-	-
	i	1,00	100	100	100
	j	1,00	100	100	100
	l	1,00	100	99	100
	m	1,00	100	100	100

¹BA-Bayesian analysis

²MP-Maximum parsimony

³NJ-Neighbor-joining

⁴ML-Maximum likelihood

*CA-Concatenated

Phylogenetic tree based on COX II region

The matrix of nucleotide sequences of COX II showed that 26% of sites were polymorphic (121 out of 470 sites) with no indel. The mean ratio between transitions and transversions for COX II was 0.48 with extremes of 0.14 and 2.16 in the second and first position of codons, respectively. Analysis of nucleotide composition showed a much skewed distribution, with a percentage 32.1% A, 11.6% C, 16.5% G and 39.9% T, (Table 2).

The overall mean distance among the *P. insidiosum* COX II sequences was of 1.8%, with a minimum of 0.0% and a maximum of 6%, as presented in the comparisons between PECM11 and PEC1/PC3/PC5. The phylogenetic relationships among the *P. insidiosum* isolates, when compared with other *Pythium* species and *L. giganteum*, showed the subdivision of a monophyletic *P. insidiosum* into three major polytomous groups (Figure 1), all with PP = 1.00 and BO's = 97 (Table 3): PI-A formed by all the Brazilian isolates of *P. insidiosum* evaluated in this study, one isolate from Costa Rica and another from Texas (US), which together account for 78% of the isolates evaluated; PI-B and PI-C were composed only of isolates of *P. insidiosum* from Thailand (12% and 10%, respectively), with both these Thai clades intermingling water and human isolates. The COX II network analysis (Figure 4) further supported this particular subdivision, but underlined a peculiar star-like pattern for the American *P. insidiosum* samples, which were revealed only poorly diversified (Table 4). At contrast, the Thai isolates presented more differentiated and diversified sequences (Figure 4 and Table 4).

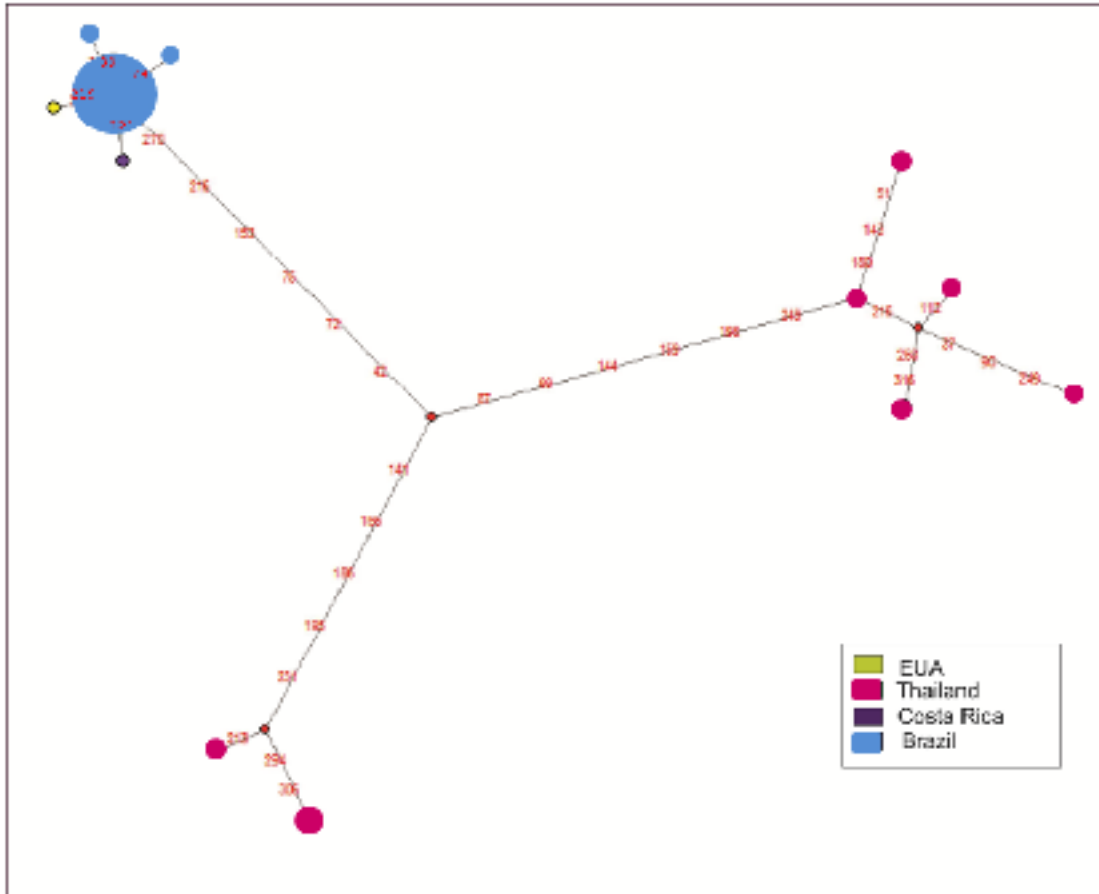


Figure 4 Network obtained for the COX II haplotypes of *P. insidiosum*. Haplotypes are represented by circles, whose area is proportional to frequency, and numbers in the lines connecting circles indicate substitutions. Minor red circles denote inferred haplotypes.

Table 4 COX II nucleotide diversity values for each of the *P. insidiosum* clades (Figure 1)

	Average number of differences	Nucleotide diversity (p)
<i>P. insidiosum</i>	8.584	0.01830
PI-A	1.138	0.00243
PI-B	5.800	0.01237
PI-C	1.500	0.00320

Phylogenetic analysis based on ITS region

The matrix of nucleotide sequences covering the ITS region showed a 37% of polymorphic sites (218 out of 594 sites) with 44% of the sites (263 out of 594 sites) showing indels. In this matrix, the ratio between transitions and transversions was 1.1 and the average nucleotide composition was 21.2% A, 19.6% C, 27.8% G and 31.4% T (Table 2).

The average distance between the ITS sequences in the *P. insidiosum* isolates was 0.9%, with a minimum of 0.0% and a maximum of 8.2%, a value found in comparisons involving PC5 and LAPEMI219. The molecular phylogeny obtained for ITS (Figure 2) showed *P. insidiosum* as monophyletic in relation to the other *Pythium* species [MP BO=100 (Table 3)], thus indicating the formation of a large polytomous group, which includes up 90% of the evaluated specimens and includes the American and Thai isolates previously subdivided into clades PI-A and PI-B by COX II (Figure 1), with low PP and BO support (Table 3). The four remaining Thai sequences formed a polytomy with basal positioning with relation to the previous clade.

Phylogenetic analysis based on the combined matrix containing ITS + COX II

The phylogenetic tree resulting from BA method of the concatenated data (Figure 3) also presents *P. insidiosum* as monophyletic in relation to the other evaluated species [PP = 1.00 and BO = 100 (Table 3)]. However, although the Thai isolates subdivision between PI- B and PI-C is properly recovered, PI-A the American samples appeared as paraphyletic in relation to PI-B [although support for this result is not high (Table 3)].

DISCUSSION

Although the ITS region is widely used for phylogenetic studies, other studies have been proposing that metabolic genes that encode proteins such as cytochrome c oxidase subunit II (COX II) are better candidates to investigate the phylogenetic relationship of the oomycetes (18). Previous studies using COX II were successful in the differentiation of *Pythium* genera and species (19, 28, 39). Villa *et al.*, (28) stated that the alignment of genes encoding metabolic proteins is less ambiguous when compared to rDNA. On the other hand, it is known that mutations are more frequent in mitochondrial genes (such COXII) compared to nuclear genes, because the mitochondria has an efficient DNA repair system like that which operates on the nuclear genes (40).

In agreement with the above expectations and with Kammarnjesadakul *et al.*, (18), in this study the COX II provided higher levels of phylogenetic information and resolution as compared to ITS. Nevertheless, the two genetic markers chosen proved to be entirely congruent to the phylogenetic relationships among different isolates of *P. insidiosum*. In fact, the only difference found between the trees obtained for COX II and ITS refers to relationships which are polytomic or poorly supported in one of the analysis sets. Although concatenation is commonly considered a way to amplify signal over noise (41, 42), we observed a dilution of the COX II signal when COX II was combined with ITS. Consequently, from now on we can consider that the phylogeny of COX II is thus far the best available reflection of the evolution of Brazilian isolates of *P. insidiosum* in comparison to the other American and Thai isolates.

The molecular analysis presented in this study supports the evolutionary affinity among American *P. insidiosum* isolates. All of the Brazilian, Central American and North American isolates were clustered in a single, entirely polytomic group, which presented only low levels of nucleotide diversity. On the other hand, the nine Thai isolates were subdivided

into two different clades, PI- B and PI-C, both basal and well differentiated as regards to the American group. Shurko *et al.*, (17) measured intraspecific variation levels among several isolates of *P. insidiosum* based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the ribosomal intergenic sequences (IGS and ITS regions). In that study, the single Brazilian isolate of *P. insidiosum* (CBS 101555) that was analyzed showed the same molecular profile of isolates from Costa Rica and United States, all grouped in cluster I, which is in agreement with the clustering of samples of these three countries in group PI-A, as obtained in our analyses. Moreover, also in consistency with our results, the phylogeny and molecular characterizations obtained by Shurko *et al.*, (16) demonstrated the presence of a genetic differentiation among isolates of *P. insidiosum* native of the Americas, Asia and Australia. As concerns the Asian samples, a more detailed analyses of the phylogenetic relationships of isolates of *P. insidiosum* of human and environmental origin from Thailand was recently conducted by Kammarnjesadakul *et al.*, (18) using the COX II and the ITS regions. These authors demonstrated the formation of three main groups (A_{TH} , B_{TH} and C_{TH}), where B_{TH} and C_{TH} were formed only by Thai strains and A_{TH} was achieved only by American strains. In our study, the five Thai isolates belonging to the group B_{TH} (18) were clustered into the PI-B clade, while the four Thai isolates previously grouped into the C_{TH} (18) were clustered in the PI-C group.

Our results demonstrate that the Brazilian isolates collected from different regions of Brazil are genetically similar and share a single common ancestor, possibly proceeding from Asian regions, since the Thai isolates were repeatedly shown as paraphyletic in relation to the American isolates. Moreover, all of the American isolates also have shown low levels of nucleotide diversity and their COX II haplotypes were distributed in a star-like network, which is consistent with a recent expansion (43). Additional sampling and the sequencing of genes with faster evolutionary rates will be useful in clarifying the suggestive evolutionary

clues obtained at this time for *P. insidiosum*. Once this scenario is accomplished it will be possible to understand the evolutionary strategies adopted by this opportunistic oomycete to invade and adapt to hosts in different tropical and subtropical regions, and search for immunological plans efficient in a broader perspective. The complete sequencing of *P. insidiosum* genome could also clarify some questions regarding to the virulence factors and host-parasite relationship which are so poorly far known in this oomycete.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Brazilian Institute CNPq and CAPES for financial support as well as the Graduate Program in Pharmacology/UFSM.

REFERENCES

1. Santurio JM, Hartz AS, Pereira DIB, Argenta JS. Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinarie*. 2006;34:1-14.
2. Miller RI & Campbell RSF. Clinical observations on equine phycomycosis. *Aust Vet J*. 1982;58:221-226. doi: 10.1111/j.1751-0813.1982.tb00681.x
3. Bosco SMG, Bagagli EJ, Araújo JP, Candeias JMG, Franco MF, Marques MEA, Mendoza L, Camargo RP, Marques SA. Human pythiosis Brasil. *Emer Infect Dis* 2005;11:715-718.
4. Gastra W, Lipman LJA, DE Cock AWAM, Exel ET, Pegge RBG, Scheurwater, RV, Mendoza L. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol*. 2010;146:1-16. doi:10.1016/j.vetmic.2010.07.019
5. Murdoch D, Parr D. *P ythium insidiosum* keratitis. *Aust NZJ Ophthalmol*. 1997; 25:177–179. doi: 10.1111/j.1442-9071.1997.tb01304.x
6. Imwidthaya P. Human pythiosis in Thailand. *Postgrad Med J*. 1994;70:558-560. doi:10.1136/pgmj.70.826.558
7. Leal ABM, Leal AT, Santurio JM, Kommers GD, Catto JB. Pitiose equina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. *Pesq Vet Bras*. 2001;21:151-156.
8. Mendoza L & Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. *Mycopathol*. 1986;94:123-129. doi: 10.1007/BF00437377

9. Meireles MCA, Correa RF, Fischman O, Zambrano AFH, Zambrano MS. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. *Mycoses*. 1993;36:139-142. doi: 10.1111/j.1439-0507.1993.tb00702.x
10. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Festugatto R, Lubeck I, Sallis ESV, Copetti MV, Alves SH, Ferreiro L. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosum developed and evaluated. *Vaccine*. 2003;21:2535-2540. doi:10.1016/S0264-410X(03)00035-5
11. Monteiro AB. Imunoterapia da pitiose equina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum*. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria. 1999.
12. Bosco SMG, Reis GM, Theodoro RC, Macoris SAG, Marques SA, Macoris D, Bagalgi E. Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region. *Med Mycol*. 2008;46:557-565.
13. Znajda N, Grooters A, Marsella R. PCR-Based detection of *Pythium* and *Lagenidium* DNA in frozen and ethanol-fixed animal tissues. *Vet Dermatol*. 2002;13:187-194. doi: 10.1046/j.1365-3164.2002.00296.x
14. Botton SA, Pereira DIB, Costa MM, Azevedo MI, Argenta JS, Jesus FPK, Alves SH, Santurio JM. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in Cutaneous Lesions of Brazilian Horses and Rabbits. *Curr Microbiol*. 2011;62:1225-1229. doi:10.1007/s00284-010-9781-4
15. Schurko AM, Mendoza L, De Cock AWAM, Bedard JEJ, Klassen GR. Development of a species-specific probe for *Pythium insidiosum* and the diagnosis of pythiosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2411-2418. doi: 10.1128/JCM.42.6.2411-2418.2004
16. Schurko A, Mendoza L, De Cock AWAM, Klassen GR. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and the Americas are explored. *Mycol*. 2003;95:200-208.
17. Schurko AM, Mendoza L, Lévesque AC, Désaulniers NL, De Cock AWAM, Klassen G. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycol Res*. 2003;107:537-544. doi: 10.1017/S0953756203007718
18. Kammarnjesadakul P, Palaga T, Sritunyalucksana K, Mendoza L, Krajaejun T, Vanittanakom N, Tongchusak S, Denuangboripant J, Chindamporns A. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (*COX II*) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS) *Med Mycol*. 2011;49:289-295. doi: 10.3109/13693786.2010.511282
19. Martin F. Phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. *Mycol*. 2000;92:711-727.

20. Lévesque CA, De Cock AW, Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycol. Res. 2004;108:1363-1383. doi:10.1017/S0953756204001431
21. Matsumoto C, Kageyama K, Suga H, Hyakumachi M. Intraspecific DNA polymorphisms of *Pythium irregulare*. Mycol Res. 1999;104:1333–1341. doi:10.1017/S0953756200002744
22. Matsumoto C, Kageyama K, Suga H, Hyakumachi M. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. Mycoscience. 2000;40:321–331. doi: 10.3852/mycologia.98.3.410
23. Shen QS. Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (Maitake) and related species and the influence of selected nutrient supplements on mushroom yield. Doctoral dissertation. The Pennsylvania State University Graduate School. 2001;141 p.
24. Martin F, Tooley P. Phylogenetic relationships of *P. hytophthora ramorum*, *P. nemorosa*, and *P. zseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death. Mycol Res. 2003;107:1379–1391. doi: 10.1017/S0953756203008785
25. Möller EM, Bahnweg G, Sandemann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Res. 1992;20:6115-6116. doi: 10.1093/nar/20.22.6115
26. Klassen GR, Balcerzak M, DE Cock AWAM. 5 S ribosomal RNA gene spacer as species specific probes for eight species of *Pythium*. Phytopathol. 1996;86:581-587.
27. White T, Bruns T, Lee S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky JJ, *et al.* (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1990;315–322.
28. Villa NO, Kageyama K, Asano T, Suga H. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and beta-tubulin gene sequences. Mycol. 2006;98:410–422. doi: 10.3852/mycologia.98.3.410
29. Staden R. Zhe Staden sequence analysis package. Mol Biotechnol. 1996;5:233–241. doi: 10.1007/BF02900361
30. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of base nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol. 1993;10:512–526.
31. Swofford, D.L. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts. 2003.

32. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003;52:696–704. doi: 10.1080/10635150390235520
33. Huelsenbeck, JP, Ronquist F, Bayes. Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001;17:754–755. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
34. Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 1974 19, 716–723. doi: 10.1109/TAC.1974.1100705
35. Posada C, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817–818. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.817
36. Nylander JAA. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University. 2004.
37. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999;16:37-48.
38. Rozas J. DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. In Posada, D. (ed.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods.* In *Molecular Biology Series.* 2009;537:337-350. DOI: 10.1007/978-1-59745-251-9_17
39. Garzon CD, Yanez JM, Moorman G.W., *P ythium cryptoirregulare*, a new species within the *P. irregulare* complex. *Mycol.* 2007;99:291–301. doi: 10.3852/mycologia.99.2.291
40. Brown TA. *Genomes.* UK: Bios. 2002;496p.
41. Baker RH, De Salle R. Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. *Syst Biol.* 1997;46:654–673. doi: 10.1093/sysbio/46.4.654
42. Remsen J, De Salle R. Character congruence and multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae. *Mol Phylogenet Evol.* 1998;9:225–235. doi:10.1006/mpev.1997.0484
43. Slatkin M, Hudson RR. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics.* 1991;129:555-62.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, observou-se uma ascensão nas pesquisas sobre pitiose, devido ao crescente número de casos diagnosticados e, principalmente, às dificuldades encontradas no tratamento das espécies afetadas (SANTURIO et al., 2006a). Os entraves nas terapias antifúngicas utilizadas podem ser explicado devido à ausência de esteróides na membrana plasmática que é o componente-alvo de ação da maioria dos antifúngicos (FOIL, 1996). O oomiceto *P. insidiosum* possui estrutura molecular da membrana plasmática diferente da dos fungos verdadeiros, sendo capaz de resistir a maioria das substâncias antifúngicas comercialmente disponíveis. Os estudos envolvendo o uso da imunoterapia avançaram significativamente, a partir de 1998 (SANTURIO et al., 2003), tornando a imunoterapia uma importante ferramenta no tratamento da pitiose equina, apresentando índices de cura que variam em torno de 70 a 80% (MONTEIRO, 1999; MENDONZA et al., 2003).

O Brasil é considerado endêmico para a pitiose equina, sendo o Pantanal Matogrossense o local onde existe uma alta prevalência da doença (LEAL et al., 2001), entretanto em outros estados também há relatos de aumento desta enfermidade (SANTURIO & FERREIRO, 2008). Diante deste fato, o uso do imunoterápico Pitium-Vac[®] produzido no País vem aumentando em todos os estados brasileiros. Contudo, existe a ocorrência de alguns casos não responsivos à imunoterapia e que podem acarretar na morte do equino (PEREIRA et al., 2007).

Estes eventos demandam a realização de estudos mais aprofundados sobre as interações entre agente-hospedeiro, especialmente envolvendo a identificação e caracterização molecular dos fatores de virulência do agente etiológico, bem como dos fatores relacionados à resposta imunológica do hospedeiro. Recentemente KRAJAEJUN et al., (2011) indentificaram sequências gênicas como possíveis fatores de virulência em um isolado humano de *P.insidiosum* da Tailândia. Porém, análises para comprovar a síntese e a função desses fatores de virulência precisam ser demonstradas. Tais informações poderão fornecer subsídios necessários ao aprimoramento do imunoterápico existente e ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Na produção do imunoterápico disponível no Brasil, utiliza-se uma cepa de *P. insidiosum* (CBS 101555) caracterizada molecularmente e isolada de um equino no RS. A possibilidade de acréscimo de novos isolados visando à melhoria deste imunoterápico impulsionou este estudo molecular na busca de variações genéticas entre os isolados brasileiros oriundos de diferentes regiões do País. A existência de variações genéticas entre os isolados de *P. insidiosum* de distintos continentes já é conhecida e foi demonstrada por SCHURKO et al., (2003a).

Os avanços nos métodos moleculares têm permitido a caracterização e estudos mais detalhados das relações filogenéticas existentes entre os vários organismos. Os dados relativos a biologia e à patogênese do *P. insidiosum* em níveis moleculares ainda são pouco conhecidos, sendo somente disponibilizadas sequências de quatro genes deste oomiceto: rRNA, *exo-1,3*-beta glucanase, quitina sintetase 2 e a cytochrome c oxidase subunidade II (KRAJAEJUN et al., 2011). Dentre estes genes destaca-se a utilização das regiões espaçadoras intergênicas do RNA ribossomal (rRNA). A região ITS, como marcador gênico tem sido utilizada devido ao fato da variabilidade na sequência de nucleotídeos ser relativamente alta (VILLA et al., 2006). Também há disponibilidade de oligonucleotídeos iniciadores que fornecem uma adequada sequência de DNA passível de ser utilizada na caracterização molecular de vários organismos eucariotos (WHITE et al., 1990).

Embora a região ITS seja amplamente utilizada para análises filogenéticas, outros estudos propõem o emprego de genes codificadores de proteínas metabólicas, tais como o citocromo c oxidase subunidade II (*Cox II*) (MARTIN, 2000; VILLA et al., 2006; GARZON et al., 2007; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011). Tais propostas são justificadas devido aos alinhamentos dos genes codificadores de proteínas metabólicas serem mais precisos quando comparados à região ITS (VILLA et al., 2006). Além disso as mutações são mais frequentes nos genes mitocondriais em comparação com genes nucleares, pois a mitocôndria apresenta um sistema de reparação de DNA diferenciado dos genes nucleares (BROWN, 2002).

Nas investigações filogenéticas dos oomicetos, o gene *Cox II* tem demonstrado melhor eficiência na distinção das relações existente entre os isolados da mesma espécie (MARTIN, 2000; VILLA et al., 2006; GARZON et al., 2007; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011). Considerando que estes genes possuem relevância para estudos de filogenia, neste trabalho ambos os marcadores genéticos foram analisados.

A filogenia molecular obtida no presente estudo, para a região ITS, demonstrou *P. insidiosum* como sendo monofilética em relação às outras espécies de *Pythium* avaliadas,

evidenciando a formação de um grande clado politômico (PI-A+PI-B) que incluiu 90% dos isolados analisados, além disso, este clado abrangeu todos os isolados brasileiros, um isolado da Costa Rica, um isolado do Texas e cinco isolados tailandeses. As demais sequências avaliadas de *P. insidiosum* oriundas da Tailândia formaram uma politomia com posicionamento basal com relação a PI-A+PI-B. SHURKO et al., (2003b) mediram os níveis de variação intraespecífica entre os vários isolados de *P. insidiosum* baseada em análise de polimorfismo de fragmentos (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) das seqüências ribossômicas intergênicas do rDNA. Porém apenas um isolado brasileiro de *P. insidiosum* (CBS 101555) foi analisado e apresentou o mesmo perfil molecular de isolados de Costa Rica e Estados Unidos. Neste trabalho os isolados americanos de *P. insidiosum* foram predominantemente reunidos em um grupo (*cluster* I). Em nossos resultados, os isolados oriundos das Américas também foram agrupados no mesmo grupo (PI-A+PI-B). Os isolados tailandeses por sua vez, apresentaram diferenças filogenéticas, formando grupos distintos visualizados tanto no presente trabalho quanto em estudos prévios (SCHURKO et al., 2003a; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011)

As análises das sequências geradas pela amplificação do gene da *Cox II* proporcionaram maiores níveis de informação filogenética, estando de acordo com as informações obtidas por KAMMARNJESADAKUL et al. (2011). Esses autores demonstraram a formação de três grupos principais, sendo B_{TH} e C_{TH} constituídos somente por linhagens tailandesas e A_{TH} formado apenas por cepas americanas. Na presente análise também foi observada a formação de três grupos distintos, os quais foram denominados de: PI-A, composto pelos isolados oriundos das Américas, PI-B e PI-C, formados pelos isolados tailandeses. Desta forma, podemos considerar que a região COX II é a melhor opção para estudar as relações filogenéticas entre os isolados de *P. insidiosum*.

No entanto, os dois marcadores genéticos escolhidos mostraram-se inteiramente congruentes com as relações filogenéticas entre os diferentes isolados brasileiros de *P. insidiosum*. A única diferença encontrada entre as árvores filogenéticas obtidas para a região COX II e ITS refere-se às relações politômicas, ou seja, há a formação de diferentes grupos, entre os isolados de *P. insidiosum*. O emprego das análises concatenadas é geralmente considerado como uma forma de amplificar os dados obtidos nas análises individuais (BAKER & DE SALLES, 1997; REMSEN & DE SALLES, 1998). Na análise conjunta dos dados, observou-se uma diluição dos grupos anteriormente obtido pela análise individual da região COX II, pois somente os grupos, PI-B e PI-C, foram devidamente recuperados.

Ao verificar-se os níveis de afinidade evolutiva os isolados de *P. insidiosum* originários das Américas, foram observados baixos níveis de diversidade de nucleotídeos e seus haplótipos COX II foram distribuídos em uma rede consistente com uma expansão recente (SLATKIN & HUDSON, 1991). A análise molecular realizada demonstrou que os isolados oriundos das diferentes regiões do Brasil são geneticamente semelhantes e compartilham um único ancestral comum, possivelmente proveniente da Ásia. Neste contexto, os resultados obtidos indicam que a cepa utilizada na produção do imunoterápico Pitium-Vac[®] é representativa dos isolados brasileiros de *P. insidiosum*, não havendo a necessidade de incluir nenhum dos isolados avaliados.

Estudos futuros incluindo maior número de isolados e o sequenciamento de genes que possam apresentar uma rápida velocidade de evolução serão úteis para esclarecer os indícios de evolução de *P. insidiosum* obtidos neste trabalho. Além disso, auxiliará na compreensão das estratégias evolutivas utilizadas por este oomiceto oportunista, as quais o tornam capaz de invadir e se adaptar a diferentes hospedeiros, nas regiões tropicais e subtropicais. O sequenciamento completo do genoma do *P. insidiosum* poderia, também, esclarecer algumas questões referentes aos fatores de virulência e à relação organismo-hospedeiro, ainda pouco conhecidos neste patógeno.

6. CONCLUSÕES

- Existe uma relação filogenética muito próxima entre os isolados de *P. insidiosum* oriundos das diferentes regiões do Brasil;
- Os isolados brasileiros de *P. insidiosum* apresentam uma baixa diversidade genética;
- Os isolados americanos de *P. insidiosum* compartilham de um ancestral comum, possivelmente originário de alguma região do continente asiático;
- A cepa CBS 101555 utilizada na produção do imunoterápico Pitium-Vac[®] é representativa dos isolados brasileiros de *P. insidiosum*;
- A região COX II é a melhor opção para estudar relações filogenéticas entre os isolados de *P. insidiosum*.

7. PERSPECTIVAS

Pesquisas futuras com o *Pythium insidiosum* deveriam incluir o sequenciamento de genes capazes de esclarecer os indícios de evolução observados neste trabalho. Além disso, o sequenciamento completo do genoma do *P. insidiosum* se tornará uma ferramenta importante na elucidação de questões, especialmente envolvendo a identificação e a caracterização molecular dos fatores de virulência deste oomiceto, bem como os fatores relacionados à resposta imunológica do hospedeiro e as demais interações agente-hospedeiro. Estes conhecimentos fornecerão subsídios necessários ao aprimoramento do imunoterápico existente e ao desenvolvimento de estratégias de controle e profilaxia da pitiose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J. et al. Phylum Oomycota. In: **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, 4th ed. 1996. Cap. 23, p. 683-737.

ALFARO, A.A.; MENDOZA, L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*, **Equine Veterinary Journal**. v.22, n. 4, p. 295–297, 1990.

AMORIM, D.S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto: Holos Editora. 2002. 136p.

ARGENTA, J.S. et al. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine, alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 2, p. 767-769, 2008.

ARGENTA, J.S. et al. *In vitro* paradoxical growth of *Pythium insidiosum* in the presence of caspofungin. **Veterinary Microbiology**. v.145, n. 3-4, p.321-323, 2010.

ARRIEL, N.H.C.O. et al. Outras Aplicações dos marcadores. In: **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV. 2006. p. 145-204.

AUSTWICK, P.K.C.; COPLAND, J.W. Swamp cancer. **Nature**. v. 250, p. 84, 1974.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Sunderland: Chapman & Hall, 2nd ed. 2004. 667p.

BAKER, R.H.; DE SALLE, B. Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian *Drosophila*, **Systematic Biology**. v. 46, n.4, p. 654–673, 1997.

BALDWIN, B.G. et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 82, n.2, p. 247-277, 1995.

BISSONNETTE, K.W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 29, n.1, p. 39-44, 1991.

BOSCO, S.M.G. et al. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.

BRIDGES, C.H.; EMMONS, C.W. A phycomycosis of horses caused by *Hyphomyces destruens*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 138, n. 11, p. 579-589, 1961.

BROWN, C.C.; ROBERTS, E.D. Intestinal pythiosis in a horse. **Australian Veterinary Journal**. v. 65, n. 3, p. 88-89, 1988.

BROWN, C.C. et al. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. **American Journal of Veterinary Research**. v. 49, n. 11, p. 1866-1868, 1988.

BROWN, T.A. **Genomes**. London: Oxford, 2nd ed. Bios. 2002. 496p.

BROWN, T.A. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. **American Journal of Veterinary Research**. v.69, n.11, p.1463-1468, 2008.

BUERGELT, C. et al. Abdominal pythiosis in a bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.37, n.2, p.186- 189, 2006.

CAMUS, A.C. et al. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 16, n.6, p. 567-571, 2004.

CARVALHO, E.C.Q. et al. *Hyphomyces destruens*: agente de “Ferida Brava” (hifomicose) em eqüídeos do Pantanal de MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XIX, 1984, Cuiabá. **Annais...**, Cuiabá, 1984, p. 311.

CAVALHEIRO, A.S. et al. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.53, n.30, p.2136-2138, 2009a.

CAVALHEIRO, A.S. et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**. v.137, n. 3-4, p. 408-411, 2009b.

CHAFFIN, M.K. et al. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 201, n. 2, p. 310-312, 1992.

CHAFFIN, M.K. et al. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 11, n. 1, p. 91-103, 1995.

CHETCHOTISAKD, P. et al. Human pythiosis in Srinagarind Hospital: one year's experience. **Journal of Medical Association of Thailand**. vol. 75, p. 248–254, 1992.

CONNOLE, M.D. Equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 49, n.4, p.215-216, 1973.

DERESINSKI, S.C.; STEVENS, D.A. Caspofungin, **Clinical Infectious Diseases**, v.36, n.1, p. 1445–1457, 2003.

DE COCK, A.W. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n.2, p. 344–349, 1987.

DE HAAN, J.; HOOGKAMER, L.J. Hyphomycosis destruens, **Veeartsennijkundige Bld voor Ned Indië**, v.13, n.3, p. 350–374, 1901.

DROUIN, V. Sur une nouvelle mycose du cheval, **Recueil De Medecine Veterinaire**, v.3, n.3, p. 337–344, 1896.

DYKSTRA, M.J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**, v. 37, n. 6, p. 427-433, 1999.

EATON, S. Osseous involvement by *Pythium insidiosum*. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.15, n.3, p.485-488, 1993.

ENGLISH, P.B.; FROST, A.J. Phycomycosis in a dog. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 291-292, 1984.

FELSENSTEI, N.J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**. v. 17, n.6, p. 368-376, 1981.

FISCHER, J.R. et al. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 6, n.6, p. 380-382, 1994.

FOIL, C.S.O. et al. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium spp.* **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 20, n.6, p. 959-966, 1984.

FOIL, C.S.O. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**. Orlando. Proceedings...: Bayer Animal Health, 1996. p.57-63.

GARZON, C.D. et al. *Pythium cryptoirregulare*, a new species within the *P. irregulare* complex. **Mycology**, v.99, n. 2, p.291–301, 2007.

GOAD, M.E. Pulmonary pythiosis in a horse. **Veterinary Pathology**, v.21, n.2, p.261-262, 1984.

GROOTERS, A.M.; GEE, M.K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, n.2, p.147-152, 2002.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 33, n.4, p. 695-720, 2003.

HEADLEY, S.A.; ARRUDA, H.N.JR. Equine cutaneous pythiosis: a report of four cases. **Ciência Rural**. v. 34, n. 1, p. 289-292, 2004.

HENDRIX, J.W. Sterols induction of reproduction and stimulation of grow of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**, v.144, p.1028-1029, 1964.

HUELSENBECK, J.P. **MrBayes: A program for the Bayesian inference of phylogeny**. New York: Department of Biology, University of Rochester. 2001. 17p.

ICHITANI, T.; AMEMIYA, J. *Pythium gracile* isolated from the foci of granular dermatitis in the horse (*Equus caballus*). **Transactions of Mycological Society Japan**. v. 21, n.2, p. 263-265, 1980.

IMWIDTHAYA, P. Systemic fungal infections in Thailand. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 32, n.5, p. 395-399, 1994a.

IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**. v. 70, n.8, p. 558-560, 1994b.

JAEGER, G.H. et al. Prostatic pythiosis in a dog. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 16, n.5, p. 598-602, 2002.

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.

KAUFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycopathologia**. v. 143, n. 1, p. 3–7, 1998.

KRAJAEJUN, T. et al. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clinical Diagnostic Laboratory of Immunology**. v. 9, n. 2, p. 378-382, 2002.

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**, 2011. Article in Press, doi:10.1016/j.funbio.2011.05.001

KWON-CHUNG, K.J. Phylogenetic spectron of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infections Diseases**, v. 19, n.1, p. 1-7, 1994.

LEAL, A.T. et al. Pitiose equina com envolvimento de linfonodos. In: **Jornada de Pesquisa, Extensão e Ensino**, IV, 1997, Santa Maria. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1997, p. 729.

LEAL, A.B.M. et al. Pitiose equina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 21, n. 4, p. 151-156, 2001a.

LEAL, A.T. et al. Pitiose – Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**. v. 31, n. 4, p. 735-743, 2001b.

LÉVESQUE, C.A.; DE COCK, W.A.M. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, v.108, n.12, p.1363-1383, 2004.

LI, D. et al. Detection of α -thalassemia in β -thalassemia carriers and prevention of Hb Bart's hydrops fetalis through prenatal screening. **Haematologica**. v. 91, n. 5, p. 649-651, 2006.

LI, W.H.; GRAUR, D. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Sunderland: Sinauer, 1991. 284.

LORETO, E.S. et al. *In Vitro* Susceptibility of *Pythium insidiosum* to Macrolides and Tetracycline Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n 7, p. 3588-3590, 2011.

MARTIN, F.N. Phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. **Mycologia**, v. 92, n.4, p.711-727, 2000.

McMULLAN, W.C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 170, n.11, p. 1293-1297, 1977.

MEIRELES, M.C.A. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **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, L. et al. Antigenic relationship between the animal and human pathogen *Pythium insidiosum* and nonpathogenic *Pythium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.11, p. 2159-2162, 1987.

MENDOZA, L. et al. Bone lesions caused by *Pythium insidiosum* in a horse. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, n.1, p. 5-12, 1988.

MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**. v. 104, n.1, p. 59-62, 1988.

MENDOZA, L.; MARIN, G. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* De Cock *et al.* 1987 and its synonym *Pythium destruens* Shipton 1987. **Mycoses**. v. 32, n. 2, p. 73-77, 1989.

MENDOZA, L. et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosi in horses. **Mycopathologia**. v. 119, n.2, p. 89-95, 1992.

MENDOZA, L. et al. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31, n. 11, p. 2967-2973, 1993.

MENDOZA, L. et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using na enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, n.6, p. 715-718, 1997.

MENDOZA, L. et al. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**. v. 21, n. 21-22, p. 2797-2804, 2003.

MENDOZA, L.; NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**. v. 43, n.6, p. 477-486, 2005.

MIYAKI, C.Y. et al. Reconstrução Filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S.R. (Ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Riberião Pereto; Holos editora. 2001. p. 97-107.

MILLER, R.I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n.8, p. 377-382, 1981.

MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Immunological studies on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, n.6, p. 227-231, 1982a.

MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 58, n.6, p. 221-226, 1982b.

MILLER, R.I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v. 81, n.1, p. 23-28, 1983.

MILLER, R.I. et al. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 186, n. 9, p. 984-986, 1985.

MONTEIRO, A.B. **Imunoterapia da pitiose equina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum***. 1999. 52 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MORAL, M.S. et al. Pitiose cutânea em equinos. **Saúde Equina**, v.1, n.3, p.14-16, 1997.

MURRAY, D.R. et al. Metastatic phycomycosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 172, n. 7, p. 834-836, 1978.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford: Oxford University Press. 2000. 333p.

NEI, M. et al. The optimization principle in phylogenetic analysis tend give incorret topologies when the number of nucleotides or aminoacids is small. **Proceeding of the national Academy of Sciences**, v.95, n.21, p. 12390- 12397, 1998.

PALMER, J.D. Mitochondrial DNA in plant systematic: applications and limitations. **Molecular Systematics of Plants**. New York: Chapman and Hall. 1992. p. 36-49.

PEREIRA, D.I.B. et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, n.5, p. 1168–1171, 2007.

PEREIRA, D.I.B. et al. Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 143-147, 2008.

PEREZ, R.C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**. v. 109, n. 1-2, p. 121-128, 2005.

PESAVENTO, P.A. et al. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. **Veterinary Pathology**. v. 45, n. 4, p. 538-541, 2008.

PUPAIBOOL, J. et al. Human pythiosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n.1, p. 517-518, 2006.

QIU, Y.L. et al. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. 404-407, 1999.

RAKICH, P.M. et al. Pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n.3, p. 262-269, 2005.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, n. 3, p. 304-311, 1996.

REIS, J.L.JR. et al. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n.3, p. 289-295, 2003.

REMSEN, J.; DE SALLE, R. Character congruence of multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, EUA, v. 9, n.2, p. 225- 235, 1998.

RIVIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 479-481, 2005.

RODRIGUES, A. et al. Intestinal dog pythiosis in Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 16, n.1, p. 37-41, 2006.

RUSSO, C.A.M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S.R. (Ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão preto: Holos Editora. 2001. p.130-136.

SALLIS, E.S.V. et al. Pitiose cutânea em equinos: 14 casos. **Ciência Rural**. v. 33, n. 5, p. 899-903, 2003.

SANAVRIA, A. et al. Pitiose em equinos: Relato de cinco casos no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 22, n. 4, p. 170-172, 2000.

SANTOS, M.N.; LONDERO, A.T. Zigomicose subcutânea em cavalos. **Pesquisas Agropecuárias Brasileiras-Série Veterinária**. v. 9, n.7, p. 7-8, 1974.

SANTOS, M.N. et al. Pitiose cutânea em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 7, n.3, p. 57-61, 1987.

SANTURIO, J.M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**. v. 141, n.13, p. 123-125, 1998.

SANTURIO, J.M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosus developed and evaluated. **Vaccine**, v.21, n. 19-29, p.2535–2540, 2003.

SANTURIO, J.M. **Pythium insidiosum: Avaliação de imuniterápico para equinos, utilizando-se coelhos como modelo experimental**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SANTURIO, J.M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006a.

SANTURIO, J.M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006b.

SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. **Pitiose: Uma Abordagem Micológica e Terapeutica**. Porto Alegre, Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008, 111 p.

SANTURIO, J.M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **The Veterinary Record**. v. 163, n. 9, p. 276-277, 2008.

SATHAPATAYAVONGS, B. et al. Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.

SCHENEIDER, H. **Métodos de análise Filogenética um guia prático**. Ribeirão Preto: Holos Editora. 2001. p.130-136.

SCHURKO, A.M. et al. Development of a species-specific probe for *Pythium insidiosum* and the diagnosis of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p.2411-2418, 2004.

SCHURKO, A.M., et al. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycological Research**, v.107, n.5, p. 537-544, 2003a.

SCHURKO, A.M. 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, 2003b.

SHENEP, J.L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Diseases**. v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.

SHIPTON, W.A. *Pythium destruens* sp., nov., na agent of equine pythiosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 25, n. 3, p. 137-151, 1987.

SLATKIN, M.; HUDSON, R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, v. 129, n.2, 555–562. 1991.

SMITH, F. The pathology of bursattee, **Veterinary Journal**, v.19, p. 16–17. 1884.

SMITH, J.B. et al. Canine pythiosis-isolation and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 1, n.4, p. 295-298, 1989.

SOLTIS, D.E. et al. Intraspecific Chloroplast DNA Variation: Systematic and Phylogenetic Implications. In: **Molecular Systematic of Plants**. New York: Chapman and Hall. 1992. p. 117-150.

SOLTIS, D.E. et al. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 133, n. 4, p. 381-461, 2000.

SUDJARITRUK, T.; SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infectious Diseases**, v.11, n.33, p. 1-4, 2011.

SWOFFORD, D.L. et al. In: **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates. 2nd ed. 1996. p. 407–514.

TABOSA, I.M. et al. Pitiose cutânea em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n.1, p. 27-30, 1999.

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.

TANPHAICHITRA, D. Tropical disease in the immunocompromised host: melioidosis and pythiosis. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 11, suppl. 7, p. S1629–1643, 1989.

THITITHANYANONT, A. et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Diseases**. v. 27, n. 6, p. 1394-1400, 1998.

THOMAS, R.C.; LEWIS, D.T. Pythiosis in dogs and cats. **The Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.20, n.1, p.63-74, 1998.

TRISCOTT, J.A. et al. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**. v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.

TÚRY, E.; COROA A.C. **Pitiose cutânea em equinos no Estado do Pará**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXV, 1997, Gramado. **Annais...** Gramado, 1997. p.150.

VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology**, 2011. Epub ahead of print, doi: 10.3109/13693786.2011.588970

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.

VIRGILE, R. et al. Human infectious corneal ulcer caused by *Pythium insidiosum*. **Cornea**. v. 12, n.1, p. 81–83, 1993.

WANACHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**. v. 22, n.27-28, p. 3613–3621, 2004.

WANG, P.H.; WHITE, J.G. Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.51, n.2, p.129-143. 1997.

WELLEHAN, J.F. et al. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 35, n. 4, p. 564-568, 2004.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols a guide to methods and applications**. London: Academic Press. 1990. p. 315-322.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. **Evolving Genes and Proteins**. New York: Academic Press. 1965. p. 97-166.

9. APÊNDICE

GLOSSÁRIO

Árvores filogenéticas são confeccionadas a partir de uma matriz contendo os dados disponíveis (morfológicos, químicos ou genéticos) sobre os táxons estudados. Estes dados são comparados, e os táxons agrupados em clados, grupos ou ramos de acordo com as semelhanças e diferenças entre si.

Apomorfia é o termo designado para definir uma característica mais recente derivada de uma característica primitiva de uma espécie ancestral.

cdNA é um DNA complementar, sendo a molécula do DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro, em uma reação catalisada pela enzima transcriptase reversa.

Clado ou **clade** é um grupo de organismos originados de um único ancestral comum.

Cladograma é um diagrama usado em cladística que mostra as relações ancestrais entre organismos, para representar a árvore da vida evolutiva.

Cladística é um método de análise das relações evolutivas entre grupos de seres vivos, de modo a obter a sua "genealogia". A Cladística se assenta no princípio fundamental de que os organismos devem ser classificados de acordo com as suas relações evolutivas.

Deleção é quando ocorre a remoção de um ou mais nucleotídeos da sequência de DNA.

Fenética é um método de análise que agrupa espécies baseada na similaridade fenotípica.

Fenograma é um diagrama usado em fenética que mostra as relações de similaridade (taxonomia numérica).

Filogenia (ou filogênese) é o termo comumente utilizado para hipóteses de relações evolutivas (ou seja, relações filogenéticas) de um grupo de organismos, isto é, determinar as relações ancestrais entre espécies conhecidas.

Haplótipos é uma combinação de alelos em diferentes *locus* no cromossomo, que são transmitidos juntos. Um haplótipo pode ser um *locus*, vários *locus* ou um cromossomo inteiro, dependendo do número de eventos de recombinação que ocorreram.

Inserção é quando ocorre pela adição de um ou mais nucleotídeos na sequência de DNA.

Locus é o local fixo num cromossomo onde está localizado determinado gene ou marcador genético.

Marcador genético é uma porção de DNA que tem sequência e posição dentro do genoma conhecidas.

Monofilético é um clado (que pode ser um táxon) que, de acordo com o conhecimento mais recente sobre as suas características anatômicas e genéticas, inclui todas as espécies derivadas de uma única espécie ancestral, incluindo esse mesmo ancestral.

Parafilético denomina-se um táxon que inclui um grupo de descendentes de um ancestral comum em que estão incluídos vários descendentes desse ancestral, porém não inclui todos eles.

Plesiomorfia é um termo empregado em cladística para designar uma característica considerada primitiva que foi modificada para uma outra mais recente, dentro de uma linhagem. Para o estabelecimento das plesiomorfias, é necessária a comparação de uma linhagem estudada com um grupo externo (uma outra linhagem supostamente aparentada filogeneticamente daquela em questão) para verificar o grupo supostamente mais primitivo.

Politômico indica a formação de três ou mais grupos em uma análise filogenética.

Táxon é uma unidade taxonómica, essencialmente associada a um sistema de classificação científica. Táxons (ou *taxa*) podem estar em qualquer nível de um sistema de classificação: um reino é um táxon, assim como um género é um táxon, assim também como uma espécie também é um táxon ou qualquer outra unidade de um sistema de classificação dos seres vivos.

Transcriptoma refere-se ao conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs) de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular. Portanto, ele é o reflexo direto da expressão dos genes.

Transição é uma modificação que ocorre quando: uma purina se transforma em outra purina ($A \leftrightarrow G$), ou uma pirimidina se transforma em outra pirimidina ($C \leftrightarrow T$).

Transversão é uma modificação que ocorrer quando: uma purina é trocada por uma pirimidina, e vice-versa ($C/T \leftrightarrow A/G$).