

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

Tatiana Corrêa Ribeiro

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA DE ISOLADOS DE
Pythium insidiosum ATRAVÉS DO MARCADOR GENÉTICO *exo1* E
SUSCETIBILIDADE AOS COMPOSTOS METÁLICOS**

Santa Maria, RS
2016

Tatiana Corrêa Ribeiro

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA DE ISOLADOS DE *Pythium*
insidiosum ATRAVÉS DO MARCADOR GENÉTICO *exo1* E SUSCETIBILIDADE
AOS COMPOSTOS METÁLICOS**

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
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Corrêa Ribeiro, Tatiana
ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA DE ISOLADOS DE
Pythium insidiosum ATRAVÉS DO MARCADOR GENÉTICO exo1 E
SUSCETIBILIDADE AOS COMPOSTOS METÁLICOS / Tatiana Corrêa
Ribeiro.-2016.
65 f.; 30cm

Orientador: Janio Morais Santurio
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2016

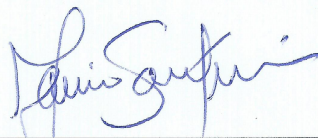
1. P. insidiosum 2. Filogenia 3. Filogeografia 4.
Teste de suscetibilidade 5. Compostos metálicos I.
Morais Santurio, Janio II. Título.

Tatiana Corrêa Ribeiro

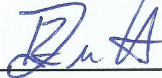
**ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA DE ISOLADOS DE
Pythium insidiosum ATRAVÉS DO MARCADOR GENÉTICO *exo1* E
SUSCETIBILIDADE AOS COMPOSTOS METÁLICOS**

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**.

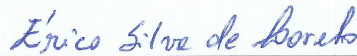
Aprovado em 26 de fevereiro de 2016:



Janjo Moraes Santurio, Dr.
(Presidente/Orientador)



Régis Adriel Zanette, Dr. (UFRGS)



Erico Silva de Loreto, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2016

AGRADECIMENTOS

Não há dúvidas de que são as pessoas e os momentos que tornam o caminho a parte mais incrível desta conquista, portanto gostaria de agradecer a todos que participaram desta jornada, em especial:

Aos meus pais, que sempre fizeram de tudo para realizar meus sonhos e que são meus maiores incentivadores, e aos meus familiares que entenderam a minha ausência e vibraram com as vitórias.

Ao Guilherme, meu namorado, por todo amor e carinho sempre e pela tranquilidade transmitida nos momentos difíceis.

Aos professores que sem dúvidas são o alicerce deste trabalho. Meu orientador professor Janio que confiou em mim desde o começo e sempre soube a dose certa entre os elogios e as críticas. E a professora Sônia Botton pelo apoio durante toda a minha jornada acadêmica e pelos inúmeros ensinamentos que levarei comigo.

As professoras Lizandra Robe e Daniela Pereira que contribuíram de forma muito significativa para este trabalho;

Também registro aqui o meu agradecimento a todos os professores que fizeram parte da minha formação, transmitindo conhecimentos e valores que levarei pra vida. Muitos de vocês inspiram o profissional que desejo ser.

A todos que os queridos colegas do LAPEMI e LABIOPAR que me auxiliaram em diversos momentos, em especial:

Dani, Carlinha e Bel, vocês foram fundamentais neste trabalho, assim como são na minha vida. As coisas que aprendi com vocês vão muito além do universo acadêmico. Muito obrigada Friends!

Jé, Doug, Vanessinha, Charlise, Dai, obrigada por toda ajuda, pelo carinho e pelos bons momentos que vivemos.

Fran e Camilinha, obrigada pela paciência e disponibilidade para me ensinar.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia pela maravilhosa oportunidade concedida.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA DE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum* ATRAVÉS DO MARCADOR GENÉTICO *Exo1* E SUSCETIBILIDADE AOS COMPOSTOS METÁLICOS

AUTOR: Tatiana Corrêa Ribeiro
ORIENTADOR: Janio Morais Santurio

Pythium insidiosum é o oomiceto aquático causador da pitiose, uma doença piogranulomatosa de difícil tratamento que acomete os animais e humanos. No Brasil, a doença é frequentemente descrita em equinos nas regiões do Pantanal Mato-grossense e no Rio Grande do Sul. A Tailândia é um país endêmico para a pitiose humana, onde a doença apresenta importantes níveis de morbidade e mortalidade. A pitiose apresenta uma progressão rápida e não há um tratamento padrão disponível, ocorrendo casos não responsivos aos quimioterápicos. *P. insidiosum* não possui ergosterol na membrana celular, e este componente é o principal alvo dos antifúngicos disponíveis atualmente. Este trabalho buscou analisar as características filogenéticas e filogeográficas de isolados brasileiros e tailandeses de *P. insidiosum* a fim de melhor compreender a evolução deste oomiceto, bem como caracterizar a susceptibilidade de *P. insidiosum* frente a compostos metálicos em busca de novas alternativas terapêuticas. Este estudo incluiu 16 sequências parciais de DNA da região *Exo-1,3-β-Glucanase (exo1)* de isolados brasileiros de *P. insidiosum*, 23 sequências de isolados tailandeses e 2 cepas-padrão. As análises filogenéticas empregaram as metodologias de máxima parcimônia (MP), Neighbor-joining (NJ), máxima verossimilhança (ML) e análise Bayesiana (BA). As análises filogeográficas envolveram a avaliação da diversidade nucleotídica, do polimorfismo, da variância molecular (SAMOVA e AMOVA), do grau de divergência genética (F_{ST}) e testes de neutralidade, os quais foram realizados com 31 das sequências de DNA *exo1* de *P. insidiosum* com origem geográfica conhecida. *exo1* provou ser um bom marcador para estudos filogenéticos e filogeográficos. Foi obtida uma árvore consenso dos quatro métodos utilizados, onde observou-se três grupos distintos compatíveis com análises anteriores com outros marcadores moleculares. Nas análises filogeográficas, os isolados tailandeses apresentaram grande diversidade, confirmando sua origem mais antiga em relação aos isolados brasileiros. Foram observados padrões de estruturação entre os isolados brasileiros, sugerindo uma expansão recente destes e apontando a necessidade de novos estudos com maior número de amostras destas regiões. Na avaliação da susceptibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* ($n=23$) aos compostos metálicos contendo cádmio, chumbo, cobre, manganês e zinco foram realizados o teste de microdiluição em caldo com base no documento M38-A2. As concentrações inibitórias e fungicidas mínimas foram estabelecidas para todos os isolados. Acetato de cobre e acetato de cádmio apresentaram concentração inibitória mínima variando 4-64 µg/mL e 16-256 µg/mL, respectivamente. Estes resultados sugerem que o cobre e o cádmio podem inibir o crescimento de *P. insidiosum*, destacando a maior atividade inibidora de acetato de cobre. Além disso, este estudo sugere que compostos de cobre e/ou cádmio podem ser utilizados em futuras pesquisas para formular fármacos eficazes contra *P. insidiosum*.

Palavras chave: Oomiceto. *P. insidiosum*. Filogenia. Filogeografia. Susceptibilidade. Metais.

ABSTRACT

PHYLOGENETIC AND PHYLOGEOGRAPHIC ANALYSIS OF *Pythium insidiosum* ISOLATES WITH THE GENETIC MARKER *Exo1* AND SUSCEPTIBILITY TO METAL COMPOUNDS

Author: Tatiana Corrêa Ribeiro

Adviser: Janio Morais Santurio

Pythium insidiosum is an aquatic oomycete that causes pythiosis, a pyogranulomatous disease of difficult treatment that infects animals and humans. In Brazil, the disease is often described in horses in the regions of the Pantanal and Rio Grande do Sul. Thailand is an endemic country for human pythiosis, where the disease has important morbidity and mortality rates. Pythiosis presents a rapid progression, there is no standard treatment available and unresponsive cases to chemotherapy are observed. *P. insidiosum* has no ergosterol in the cellular membrane, and this component is the main target of antifungal drugs currently available. This study aimed to analyze the phylogenetic and phylogeographic characteristics of Brazilian and Thai isolates of *P. insidiosum* in order to better understand the evolution of this oomycete, as well as to characterize the susceptibility of *P. insidiosum* against metal compounds in search of new therapeutic alternatives. This study included 16 partial DNA sequences of *Exo-1,3-β-glucanase* gene (*Exo1*) of Brazilian isolates of *P. insidiosum*, 23 sequences of Thai isolates and 2 standard strains. Phylogenetic analyses employed the methods of maximum parsimony (MP), neighbor-joining (NJ), maximum likelihood (ML), and Bayesian analysis (BA). The phylogeographic analyses involved evaluation of the nucleotide diversity, of polymorphism, of molecular variance (SAMOVA and AMOVA), the degree of genetic diversity (F_{ST}) and neutrality tests, which were performed with 31 *exo1* the DNA sequences of *P. insidiosum* with known geographical origin. *exo1* demonstrated to be a good marker for phylogenetic and phylogeographic studies. A tree consensus of the four methods was obtained, and observed three distinct groups consistent with previous analyzes with other molecular markers. In the phylogeographic analyses, the Thai isolates display a high diversity, confirming its earlier origin in relation to Brazilian isolates. Structuring patterns were observed among Brazilian isolates, suggesting a recent expansion of these and indicates the need for further studies with larger sample size of these regions. In the evaluation of *in vitro* susceptibility of *P. insidiosum* (n = 23) to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese, and zinc were performed using microdilution broth test based on document M38-A2. The minimum inhibitory and fungicidal concentrations were established for all isolates. Copper acetate and cadmium acetate showed minimal inhibitory concentration range of 4-64 mg/mL and 16-256 mg/mL, respectively. These results suggest that copper and cadmium can inhibit the growth of *P. insidiosum*, emphasizing the most inhibitory activity of copper acetate. Furthermore, this study suggests that compounds of copper and/or cadmium can be used in future research to develop effective drugs against *P. insidiosum*.

Keywords: Oomycete. *P. insidiosum*. Phylogeny. Phylogeography. Susceptibility. Metals.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1: List of isolates of <i>Pythium</i> and <i>Phytophthora</i> species used in this study for Exo-1,3- β -Glucanase (<i>Exo1</i>) DNA coding sequences.	28
Table 2: Results of diversity analysis	33
Table 3: Analysis of molecular variance (AMOVA) for populations of <i>P. insidiosum</i> from three groups of localities based on <i>exo1</i> sequences.	34
Table 4: Pairwise F_{ST} values for the three populations obtained in the AMOVA.....	34
Table 5: Results of neutrality tests (Tajima's D and Fu's F_s).	35

Capítulo 2

Table 1: Minimum inhibitory and fungicidal concentrations for lead acetate, zinc acetate, zinc sulfate, manganese acetate, cadmium acetate and copper acetate against <i>Pythium insidiosum</i> isolates (n=23).....	54
--	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figure 1: Phylogenetic relationship among the examined *Pythium insidiosum* isolates inferred by posterior probability (PP), maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), and Neighbor-Joining (NJ) analyses based on *Exo-1,3-β-Glucanase* gene. The numbers along branches indicate bootstrap values and posterior probabilities resulting from different analyses in the order: PP/ML/MP/NJ. 32
- Figure 2: Map of locations sampled for Brazil and Thailand for analysis of genetic diversity. The symbols represent the structure observed in AMOVA. Saraburi is identified with a different symbol once has isolates in both clade 2 and 3. 34

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 AGENTE ETIOLÓGICO.....	13
3.2 A DOENÇA	13
3.2.1 Pitiose equina	14
3.2.2 Pitiose canina	15
3.2.3 Pitiose em humanos	15
3.3 DIAGNÓSTICO.....	15
3.4 TRATAMENTO	16
3.5 ANÁLISES MOLECULARES ENVOLVENDO <i>P. insidiosum</i>	18
3.6 ANÁLISES MOLECULARES	19
3.6.1 Análise filogenética.....	19
3.6.2 Métodos de análise filogenética.....	20
3.6.3 Análises filogeográficas.....	21
3.7 USO DE METAIS COMO ANTIMICROBIANOS	22
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS	23
CAPÍTULO 1.....	24
CAPÍTULO 2.....	44
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está composta por dois artigos científicos os quais se encontram no item **ARTIGOS CIENTÍFICOS** que representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contido neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se as citações contidas nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

A pitiose é uma doença piogranulomatosa causada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum*. O gênero *Pythium* apresenta mais de 120 espécies, a maioria habitante do solo e patógenos de plantas. A doença é mais prevalente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (ALEXOPOULOS, 1996). O Brasil é considerado endêmico para a pitiose equina, todavia os casos de pitiose humana são, em sua maioria, relatados na Tailândia (LEAL et al., 2001a; KRAJAEJUN et al., 2006).

A espécie equina é a mais afetada principalmente nas formas cutâneas e subcutâneas. Nestes animais, a lesão típica é um granuloma subcutâneo semelhante a um tumor com a presença de eosinófilos e massas necróticas denominadas *kunkers*, além de hifas de *P. insidiosum* (GAASTRA et al., 2010). A espécie canina é a segunda mais acometida e as infecções se manifestam como piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (GROOTERS, 2003; CONNOLLY et al., 2012; FERNANDES et al., 2012). Casos esporádicos têm sido relatados em bovinos (PÉREZ et al., 2005), ovinos (PESSOA et al., 2012), felinos (BISSONNETTE et al., 1991) e aves (PESAVENTO et al., 2008). Nos últimos anos é crescente o número de relatos de pitiose em espécies não domésticas (GROOTERS, 2003; CAMUS et al., 2004; VIDELA et al., 2012). Em humanos a infecção geralmente ocorre em portadores de B-talassemia e as formas mais comuns são: cutânea, vascular e ocular (KRAJAEJUN et al., 2006).

As alternativas terapêuticas para as infecções causadas por *P. insidiosum* incluem: remoção cirúrgica da área afetada, quimioterapia e imunoterapia (GAASTRA et al., 2010). O tratamento é complicado pelas características singulares do agente, principalmente pela ausência de ergosterol na membrana plasmática, que é o componente alvo da ação da maioria dos fármacos antifúngicos. Por isso, os antifúngicos são, em sua maioria, ineficientes e a maioria dos animais acometidos não sobrevive em decorrência da infecção. Os fitopatógenos do gênero *Pythium* são sensíveis aos inseticidas normalmente utilizados em plantas, porém esses compostos apresentam toxicidade para os mamíferos, impedindo seu uso no tratamento da pitiose (SANTURIO et al., 2006a).

Novas abordagens estão sendo estudadas para o combate de infecções fúngicas de difícil tratamento, como por exemplo, a complexação de metais aos fármacos comercialmente disponíveis (CHOHAN et al., 2006; ŽIVEC et al., 2012). Neste sentido, nanopartículas de óxido de cobre foram empregadas em testes *in vitro* onde se observou inibição no crescimento de *P. aphanidermatum* e *P. ultimum* (Zabrieski et al., 2015), os quais são oomicetos do

mesmo gênero de *P. insidiosum*. Desta forma, torna-se importante conhecer o perfil de suscetibilidade de *P. insidiosum* a metais, a fim de utilizá-los futuramente em formulações para o tratamento da pitiose.

Estudos vêm sendo realizados a fim de elucidar as relações filogenéticas de isolados de *P. insidiosum* de diferentes regiões. Estas análises são importantes para observar a variabilidade genética presente na espécie em estudo, visando aperfeiçoar as técnicas de diagnóstico, elucidar diferenças na virulência e patogenicidade entre os isolados e diminuir o índice de falha terapêutica com os tratamentos disponíveis atualmente. Tradicionalmente, os estudos de evolução molecular são realizados utilizando-se sequências obtidas a partir do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade II ou de sequências obtidas do RNA ribossomal e intergênicas (KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; AZEVEDO et al., 2012). Entretanto, estudos mais recentes sugerem o uso de novos marcadores, como o gene *Exo-1,3-β-Glucanase (exo1)* que codifica uma proteína imunodominante de *P. insidiosum* com potencial para desenvolvimento de testes imunológicos, como candidata a imunoterapia e em estudos filogenéticos (KRAJAEJUN et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Analisar as características filogenéticas e filogeográficas de isolados brasileiros e tailandeses de *P. insidiosum*, bem como caracterizar a suscetibilidade de *P. insidiosum* frente a compostos metálicos.

2.2. Objetivos específicos

- Utilizar o gene *Exo-1,3-β-Glucanase (Exo1)* para a caracterização molecular de isolados de *P. insidiosum* oriundos de diferentes regiões do Brasil;
- Caracterizar filogeneticamente os isolados brasileiros de *P. insidiosum*;
- Comparar geneticamente os isolados brasileiros e tailandeses de *P. insidiosum* empregando o marcador *exo1*;
- Investigar o perfil filogeográfico dos isolados brasileiros e tailandeses de *P. insidiosum*;
- Avaliar a suscetibilidade dos isolados de *P. insidiosum* frente aos compostos metálicos de cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn) e identificar o metal com maior potencial para o desenvolvimento de formulações eficazes contra *P. insidiosum*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático causador da pitiose. Este micro-organismo pertence ao Reino *Straminipila*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* (ALEXOPOULOS, 1996).

Embora microscopicamente apresente crescimento micelial semelhante aos fungos verdadeiros, análises filogenéticas mostram que as espécies do gênero *Pythium* estão mais relacionadas com diatomáceas e algas (KWON-CHUNG, 1994). Os oomicetos diferem taxonomicamente dos fungos em nível celular em virtude das diferenças na parede e composição da membrana. A ausência do ergosterol na membrana destes oomicetos, a produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada e a presença de β -glucanas, celulose e hidroxipolina na parede celular são algumas das características que os diferenciam dos fungos verdadeiros (SANTURIO et al., 2006a).

A identificação morfológica das espécies de *Pythium* baseia-se, frequentemente, na visualização microscópica das estruturas reprodutivas (oogônia e anterídio). Similarmente as outras espécies do gênero *Pythium*, *P. insidiosum* cresce em meio ágar como uma colônia fúngica de hifas não septadas ou esparsamente septadas. Entretanto, raramente observa-se a produção de estruturas reprodutivas por *P. insidiosum* (MENDOZA et al., 1996).

O crescimento a 37 °C e a capacidade de produzir zoósporos móveis biflagelados nas culturas de água em associação com materiais vegetais são considerados sugestivo de *P. insidiosum*. Os zoósporos são estruturas unicelulares sem parede celular que possuem dois flagelos que permitem sua locomoção no meio aquático. Todavia, esta técnica não deve ser utilizada de forma isolada para a identificação definitiva porque outras espécies do gênero *Pythium* também produzem zoósporos, bem como outros membros dos gêneros *Lagenidium* e *Phytophthora* (BENTINCK-SMITH et al., 1989; CHAIPRASERT et al., 1990). Além disso, a produção de zoósporos no laboratório pode ser difícil, especialmente a partir de isolados que foram subcultivados repetidamente (GROOTERS & GEE, 2002).

3.2 A PITIOSE

Os zoósporos são a forma infectante de *P. insidiosum*. As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento da infecção, uma vez que os zoósporos desenvolvem-

se essencialmente no meio aquático e, preferencialmente, em temperatura entre 30 a 40 °C. Quando encontram plantas ou animais, os zoósporos se incistam e formam um tubo germinativo que originará um novo micélio. A grande maioria dos casos de pitiose é observada durante ou após a estação chuvosa (SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010).

Em animais, a infecção costuma se apresentar na forma cutânea (SANTURIO et al., 2006a) ou intestinal (BERRYESSA et al., 2008); contudo, infecções pulmonares (GOAD, 1984), ósseas (WORSTER et al., 2000) e com disseminação sistêmica (REIS et al., 2003) foram relatadas. Em humanos observam-se casos cutâneos, oculares, sistêmicos e eventualmente em locais não usuais (GAASTRA et al., 2010).

A doença não apresenta predisposição por sexo, idade ou raça. A pitiose tem sido relatada em diversas espécies incluindo o homem, animais domésticos e selvagens (GAASTRA et al., 2010); entretanto, a maioria dos casos em animais envolve as espécies equina e canina (GROOTERS, 2003). Casos esporádicos têm sido relatados em bovinos (PÉREZ et al., 2005), ovinos (PESSOA et al., 2012), felinos (BISSONNETTE et al., 1991) e aves (PESAVENTO et al., 2008). A pitiose também tem sido relatada em espécies não domésticas (GROOTERS, 2003; CAMUS et al., 2004; VIDELA et al., 2012).

3.2.1 Pitiose equina

A espécie equina é a mais afetada pela pitiose, principalmente nas formas cutâneas e subcutâneas. As lesões cutâneas se assemelham a um tumor e são formadas por tecido necrosado, eosinófilos e hifas de *P. insidiosum*. É frequente a presença de *kunkers* que são massas branco-amareladas semelhantes a corais, formadas por hifas, colágeno, arteríolas e células inflamatórias, especialmente eosinófilos (LEAL et al., 2001b; GAASTRA et al., 2010). Reis et al. (2003) relataram a disseminação de *P. insidiosum* a partir de lesões subcutâneas para outros órgãos em três equinos no estado do Rio de Janeiro, alertando para outros sítios de desenvolvimento da doença.

Casos de pitiose equina foram relatados em diversos estados brasileiros, contudo com maior ocorrência na região do Pantanal Mato-grossense (LEAL et al., 2001a; SANTOS et al., 2014) e Rio Grande do Sul (WEIBLEN, 2015). As regiões pantanosas e alagadiças favorecem a disseminação da doença, uma vez que apresenta as condições ideais para o desenvolvimento deste oomiceto. As chuvas intensas e prolongadas que ocorrem nos meses de verão mantem o meio necessário para o desenvolvimento do agente e a ocorrência de inundações pode ajudar a

disseminar o oomiceto sobre uma área mais ampla (MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006a).

3.2.2 Pitiose canina

Em cães a doença manifesta-se com maior frequência na forma gastrointestinal. Os sintomas gastrointestinais frequentemente observados incluem anorexia, perda de peso, vômitos e diarreia (BERRYESSA et al., 2008). As lesões caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino, compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose, intenso infiltrado eosinofílico e presença de hifas. Casos cutâneos também ocorrem e apresentam-se como dermatites piogranulomatosas ulcerativas, com áreas de necrose infiltrada por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos (SANTURIO et al., 2006a).

3.2.3 Pitiose em humanos

A maioria dos casos de pitiose em humanos ocorre na Tailândia (KRAJAEJUN et al., 2006; PERMPALUNG et al., 2015;). Em 2005, Bosco et al. descreveram o primeiro caso de pitiose humana no Brasil. Grande parte dos casos notificados na Tailândia ocorrem em indivíduos que exercem atividades agrícolas, pois a exposição destes indivíduos a áreas alagadas contribui para o aumento da incidência da doença, uma vez que facilita o contato com a forma infectante. Adicionalmente, observa-se uma associação entre pitiose e doenças hematológicas, sendo elevado o número de pacientes com pitiose que apresentam talassemia (doença que afeta em torno de 1% da população tailandesa), determinando casos de pitiose cutânea/sub-cutânea, vascular e disseminada. (KRAJAEJUN et al., 2006; KRAJAEJUN et al., 2008).

3.3 DIAGNÓSTICO

Os aspectos clínicos e histopatológicos, bem como o isolamento e a identificação do agente são as formas de diagnóstico mais utilizadas para a pitiose (GAASTRA et al., 2010).

Os aspectos clínicos são ferramentas limitadas para o diagnóstico da pitiose, uma vez que outras patologias também podem apresentar lesões semelhantes, como por exemplo:

habronemose, neoplasia, tecido de granulação exuberante, bem como granulomas fúngicos e bacterianos (SANTURIO et al., 2006a). Neste sentido torna-se indispensável a utilização da cultura microbiológica e/ou dos testes sorológicos e moleculares para a correta identificação do agente.

A identificação laboratorial do agente pode ser realizada a partir do cultivo de materiais biológicos, especialmente dos coletados de lesões, como por exemplo os *kunkers*. O cultivo deve ser realizado em placas de ágar *Sabouraud 2%* com incubação a 37 °C. As amostras positivas podem ser detectadas com 24 a 48h de incubação. A observação microscópica de hifas esparsamente septadas é sugestiva da presença do agente (SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). Por muito tempo, a indução de zoósporos foi considerada uma técnica de confirmação do diagnóstico, uma vez que não se conhecia relatos de outras espécies produtoras de zoósporos que causassem doença em mamíferos. Entretanto, Calvano et al. (2011) relataram um caso de pitiose humana causada por *Pythium aphanidermatum*.

O diagnóstico precoce da pitiose está intimamente relacionado com o sucesso do tratamento (GAASTRA et al., 2010). Diante disso, técnicas sorológicas e moleculares também podem ser empregadas no diagnóstico laboratorial (LEAL et al., 2001b; SCHURKO et al., 2004; SANTURIO et al., 2006b; BOTTON et al., 2011).

As técnicas imunológicas utilizadas para diagnóstico incluem: imunodifusão (PRACHARKTAM et al., 1991), imunohistoquímica (BROWN et al., 1988) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (MENDOZA et al., 1997). O ELISA é utilizado no diagnóstico da enfermidade devido a sua sensibilidade, especificidade e rapidez, permitindo assim, um diagnóstico precoce. Além disso, permite também o monitoramento da resposta humoral em animais infectados e em tratamento por imunoterapia (SANTURIO et al., 2006b).

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos envolvendo diagnóstico molecular. Grooters & Gee (2002) desenvolveram um ensaio de reação da polimerase em cadeia *nested* para detecção e identificação de *P. insidiosum*. Posteriormente, outros trabalhos relataram o uso e vantagens do diagnóstico molecular por reação da polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento de regiões do DNA de *P. insidiosum* (BOTTON et al., 2011; THONGSRI et al., 2013). Devido ao custo e complexidade das análises moleculares, a aplicação destas técnicas é limitada a poucos laboratórios de diagnóstico.

3.4 TRATAMENTO

As principais alternativas de tratamento para a pitiose incluem: quimioterapia, remoção cirúrgica e imunoterapia. A escolha do tratamento está diretamente relacionada com a espécie acometida e o tamanho e evolução clínica da lesão. Devido a isso, salienta-se a importância do diagnóstico correto e precoce da enfermidade (GAASTRA et al., 2010).

A utilização de fármacos antifúngicos é dificultada pelas singularidades do agente, visto que o oomiceto *P. insidiosum* não possui ergosterol na membrana plasmática e possui β -glucanas e celulose em sua parede, enquanto os fungos verdadeiros possuem o ergosterol como principal esteroide da membrana plasmática e a quitina na composição da parede. Muitos antifúngicos agem sobre essas estruturas e por isso não são eficazes frente a este oomiceto (SANTURIO et al., 2006a).

Estudos avaliando a suscetibilidade de *P. insidiosum* aos fármacos comercialmente disponíveis são frequentemente realizados. Caspofungina, um antifúngico que bloqueia a síntese de 1,3-beta-glucana, apresentou atividade fungistática limitada frente a isolados de *P. insidiosum* (PEREIRA et al., 2007). Argenta et al. (2008) testaram os antifúngicos terbinafina, itraconazol e voriconazol, onde a terbinafina demonstrou ser o fármaco mais efetivo com concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de 0,5 a 8 mg/litro e as combinações de terbinafina com voriconazol ou itraconazol apresentaram sinergismo de 17%. Cavalheiro et al. (2009) avaliou a associação de terbinafina com anfotericina B, que apresentou sinergismo de 41,18%

Nos últimos anos diversos antibióticos vêm sendo testados frente a *P. insidiosum* (LORETO et al., 2011; JESUS et al., 2014; LORETO et al., 2014). No trabalho de Loreto et al. (2011) os antibióticos doxaciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, azitromicina, claritromicina e eritromicina foram testados *in vitro* frente a *P. insidiosum*. Os resultados foram bastante promissores, pois minociclina apresentou a menor CIM variando de 0,125 a 2 μ g/ml. Doxaciclina e claritromicina apresentaram CIM de 0,5–8 μ g/ml.

Desta forma, testes *in vitro* evidenciam que frequentemente fármacos antibacterianos apresentam maior efeito inibitório no crescimento de *P. insidiosum* em relação aos antifúngicos. LORETO et al. (2014) avaliaram a associação de antibacterianos e antifúngicos. Nesta pesquisa, azitromicina, minociclina e tigeciclina apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIMs) menores que 1 μ g/ml enquanto anfotericina, equinocandinas e triazólicos apresentaram CIMs maiores que 32 μ g/ml. Associações de minociclina e anfotericina e de claritromicina e micafungina apresentaram sinergismo *in vitro* de 73,33% (JESUS et al., 2014).

Embora os estudos *in vitro* evidenciem a atividade de antifúngicos e antibacterianos frente a *P. insidiosum* (PEREIRA et al., 2007; LORETO et al., 2014), o sucesso com o tratamento quimioterápico isolado raramente é atingido (KRAJAEJUN et al., 2006; THANATHANEE et al., 2013).

A remoção cirúrgica da região afetada é considerada um dos tratamentos mais eficazes para pitiose. Todavia, há limitações para sua utilização, incluindo a localização anatômica e a extensão da lesão e as chances de recidivas (WANACHIWANAWIN et al., 2004; GAASTRA et al., 2010).

Diante de todas as dificuldades encontradas no tratamento da pitiose, a imunoterapia é uma alternativa promissora. O primeiro imunoterápico contra a doença foi desenvolvida por Miller (1981) a mais de 30 anos. Posteriormente, muitas pesquisas vêm sendo realizadas para melhorar as características dos imunoterápicos, utilizando diferentes preparações e vias de administração (MENDOZA et al., 1992; SANTURIO et al., 2003; WEIBLEN, 2015).

Os imunoterápicos utilizados para o tratamento da pitiose são produzidos a partir de hifas inativadas e sonicadas de *P. insidiosum*. Acredita-se que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia se baseiem 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. Possivelmente, os antígenos presentes no imunógeno induzem esta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais. Os índices de cura através da imunoterapia aumentam com a associação com o tratamento cirúrgico (MILLER et al., 1981; SANTURIO et al., 2003).

Em virtude da ausência de uma abordagem terapêutica totalmente eficaz no tratamento da pitiose a combinação de diferentes terapias é bastante utilizada na prática clínica. Pereira et al. (2013) revisaram casos de pitiose canina demonstrando que a associação de mais de uma terapia aumenta as chances de cura em relação a monoterapia.

Pesquisas envolvendo novos fármacos e substâncias alopáticas e fitoterápicas com potencial antimicrobiano frente a *P. insidiosum* estão sendo realizadas, incluindo óleos e extratos de plantas (LORETO et al., 2014; FONSECA et al., 2015a,b; JESUS et al., 2015).

3.5 ANÁLISES MOLECULARES ENVOLVENDO *P. insidiosum*

Estudos moleculares vêm sendo realizados a fim de serem utilizados como ferramenta para diagnóstico (GROOTERS & GEE, 2002), bem como para elucidar os mecanismos de

patogenicidade de *P. insidiosum* (KRAJAEJUN et al., 2011). Análises filogenéticas de isolados de *P. insidiosum* através das regiões espaçadoras intergênicas do RNA ribossomal (rRNA) (ITS) e da região mitocondrial *citocromo c oxidase II (coxII)*, demonstraram a existência de grupos distintos entre os isolados deste micro-organismo. A região ITS apresenta maior resolução para a avaliação de variações intergênicas (AZEVEDO et al, 2012; KAMMARNJESADAKUL et al, 2011). Krajaejun et al. (2011) construíram uma biblioteca de cDNA de um isolado de *P. insidiosum* e compararam as sequências geradas com sequências gênicas codificadoras de fatores de virulência de outros oomicetos, com este estudo, os autores concluíram que estes genes podem ser úteis para futuras análises filogenéticas.

O gene *Exo-1,3-β-Glucanase (Exo1)* codifica uma proteína imunodominante com potencial para ser estudada no micro-organismo *P. insidiosum* a fim de desenvolver testes imunológicos, como candidata a imunoterapia e em estudos de filogenia. Este gene demonstrou a capacidade de distinguir grupos filogenéticos em estudo realizado com isolados clínicos de *P. insidiosum* de humanos na Tailândia (KRAJAEJUN et al., 2010).

3.6 ANÁLISES MOLECULARES

3.6.1 Análise filogenética

A filogenia pode ser considerada genericamente como o conjunto da história de ancestralidade entre todas as espécies, bem como o diagrama que representa esta história. Esta ciência é uma entidade transtemporal que corresponde à sequência de todos os momentos das espécies ao longo do tempo, desde o seu surgimento, portanto os estudos realizados devem ser considerados cortes temporais (AMORIM, 2002).

Existe uma relação filogenética entre todas as espécies existentes, entretanto é através da sistemática filogenética que se avalia o quão próxima uma espécie é de uma ou outra(s) espécie(s). O grau de relação filogenética pode ser representado em árvores evolutivas nas quais são dispostas as relações de parentesco entre grupos biológicos baseadas na modificação de seus atributos através do tempo (HENNIG, 1965).

Inegavelmente a macroevolução trata-se de uma extrapolação da microevolução (mutações, mudanças cromossômicas, deriva genética, seleção natural, entre outras). Contudo, é importante identificar a ocorrência destes diferentes processos microevolutivos e avaliar se refletem isoladamente nos fenômenos macroevolutivos ou permitem prever suas tendências e

padrões evolutivos. Os estudos de filogenia e hereditariedade fornecem um ponto de partida para compreender essas conexões (AVISE, 1987).

3.6.2 Métodos de análise filogenética

As metodologias de análises filogenéticas podem ser divididas em fenéticas e cladísticas. As análises fenéticas baseiam-se em medidas de distância ou de similaridade genética e mostram as diferenças entre os caracteres em números (ex: Neighbor-Joining, NJ), enquanto as análises cladísticas calculam árvores para cada caracter e indicam qual a melhor árvore através da determinação daquela que requer o menor número de mudanças (Máxima parcimônia, MP) ou aquela mais provável estatisticamente (máxima verossimilhança, ML e análise Bayesiana, BA) (AMORIM, 2002; AVISE, 2004).

O método NJ é baseado no cálculo das distâncias evolutivas para todos os indivíduos e reconstrução de uma árvore que considera as relações entre todas as distâncias (SCHENEIDER, 2007). É um método simples e rápido, pois requer menor capacidade computacional. Embora seja útil para grandes conjuntos de dados apresenta a desvantagem de demonstrar na árvore filogenética apenas uma topologia possível (NEI et al., 1998; NEI & KUMAR, 2000).

A análise MP busca as 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). Este tipo de análise costuma gerar mais de uma árvore, neste caso deve-se optar por uma árvore consenso, a qual represente uma forma conveniente de representar o grau de concordância entre todas as árvores obtidas na análise MP (NEI et al., 1998).

A análise ML procura a árvore filogenética com maior probabilidade de representar a evolução dos dados observados. Nesta análise são atribuídos valores independentes de probabilidade para cada substituição inferida de modo que a topologia final será o produto de todas as probabilidades observadas (FELSENSTEIN, 1981).

A análise BA é um método estatístico altamente relacionado com a ML. A hipótese ótima é a que apresenta maior probabilidade posterior. A probabilidade posterior é dada pela verossimilhança multiplicada pela probabilidade *a priori* desta hipótese (HOLDER & LEWIS, 2003).

Todas as metodologias apresentadas possuem vantagens e desvantagens que variam conforme as características e volume dos dados analisados (HOLDER & LEWIS, 2003).

Portanto, usualmente, os dados são testados para mais de uma abordagem a fim de explorar suas vantagens e minimizar os possíveis erros devido as suas limitações (OHNISHI et al., 2003; YAN et al., 2008)

3.6.3 Análises filogeográficas

Em 1987, Avise et al. atribuíram à filogeografia um papel importante na evolução das espécies. As investigações filogeográficas buscam inferir sobre muitos aspectos da evolução das populações a partir dos dados genéticos. O principal objetivo destas análises é inferir sobre a origem da estruturação geográfica dentro e entre as espécies relacionadas (AVISE et al., 2000; BLOOMQUIST et al., 2010).

Uma grande variedade de técnicas podem ser empregadas para analisar as características filogeográficas de uma população (GARRICK et al., 2010). Os testes de diversidade, neutralidade e estruturação são muito utilizados para caracterizar populações (GUTIÉRREZ et al., 2010; RUIZ-SANCHEZ & ORNELA, 2014; CHEN et al., 2015).

A diversidade genética de uma população é gerada por mutações que provocam mudanças nos nucleotídeos de uma sequência de DNA ou é introduzida por populações imigrantes. Esta diversidade pode ser estudada a partir da variação observada entre as sequências de DNA em um grupo em estudo (população, espécie ou grupo de espécies). De modo geral, a diversidade genética é descrita através da avaliação do nível de diversidade nucleotídica (π) e de medidas de polimorfismo, sítios de substituições e heterozigose esperada (NEI, 1987; FRANKHAM et al., 2010).

Os testes de neutralidade são capazes de constatar se os dados observados são significativamente diferentes daqueles esperados, assumindo modelo de Wright-Fisher, onde as mutações são neutras. Assim, assume-se uma hipótese nula de neutralidade, que, se refutada, pode indicar a interferência de processos evolutivos nas populações em questão. Os desvios em relação à neutralidade são tradicionalmente interpretados como resultado de diversos tipos de seleção ou de mudanças na estrutura populacional (FISHER, 1930; WRIGHT, 1931).

O teste D de Tajima compara o número de sítios segregantes com a diversidade nucleotídica (TAJIMA, 1989). F_s de F_u leva em conta a polaridade das mutações, ou seja, qual o possível haplótipo ancestral. Os valores de F_s tendem a ser negativos quando ocorrem excesso de mutações recentes. Resultados significativos para estes testes costumam ser

relacionadas com expansão populacional recente ou seleção purificadora, por outro lado os valores positivos são atribuídos à seleção balanceadora (FU, 1997).

Para avaliar o grau de estruturação de uma população utiliza-se a medida de F_{ST} que é o valor de divergência genética total. Este índice mede os efeitos da subdivisão da população e a redução da heterozigotia de uma subpopulação devido à deriva genética. O resultado de F_{ST} varia de 0 a 1 e valores altos indicam considerável grau de diferenciação entre as populações (WRIGHT, 1950).

Spatial Analysis of Molecular Variance (SAMOVA) é uma análise espacial de variância molecular que procura correspondência entre a distribuição geográfica, através das coordenadas geográficas de cada localidade e a distância relativa à diversidade nucleotídica. Esta análise testa as melhores combinações de grupamentos de subpopulações para todas as possíveis combinações de grupos, delimitadas pelo número de subpopulações. *Analysis of Molecular Variance* (AMOVA) ou avalia a origem desta variância molecular espacial, calculando a porcentagem de diferença entre ou intra populações (DUPANLOUP et al., 2002).

3.7 USO DE METAIS COMO ANTIMICROBIANOS

A coordenação de metais aos antimicrobianos é considerada uma alternativa promissora no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (ROCHA et al., 2011). Complexos de sulfonamidas e metais foram testados e demonstraram atividade antifúngica frente a isolados de *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Microsporium canis*, *Pseudallescheria boydii*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton schoenleinii* (CHOHAN et al., 2006). Compostos a base de Tiobendazol foram sintetizados e complexados com Cobre e provocaram inibição do crescimento de *C. albicans* (DEVEREUX et al., 2004).

Além disso, recentemente, Zabrieski et al. (2015) demonstraram o efeito inibitório de nanopartículas de óxido de Cobre e Zinco frente aos oomicetos *Pythium ultimum* e *P. aphanidermatum*.

Portanto, realizar testes do perfil de suscetibilidade de *P. insidiosum* pode

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

CAPÍTULO 1

Phylogenetic and phylogeographic analysis of *P. insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based on Exo-1,3- β -Glucanase gene

Artigo a ser submetido à Veterinary Microbiology

Title: Phylogenetic and phylogeographic analysis of *P. insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based on Exo-1,3- β -Glucanase gene

Authors: Tatiana Corrêa Ribeiro¹, Carla Weiblen², Maria Isabel de Azevedo¹, Sônia de Avila Botton², Lizandra Jaqueline Robe³, Daniela Isabel Brayer Pereira⁴, Danieli Urach Monteiro⁵, Douglas Miotto Lorensetti⁵, Janio Morais Santurio^{1#}

¹Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

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

³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

⁴Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

⁵Laboratório de Parasitologia Humana e Biologia Molecular, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

#Address for correspondence:

Janio M. Santurio

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima nº 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: janio.santurio@gmail.com

ABSTRACT

Pythium insidiosum is an important oomycete due to its ability to infect humans and animals. It causes pythiosis, a disease of difficult treatment that occurs more frequently in humans in Thailand and in horses in Brazil. The aim of this study was to investigate the phylogenetic and phylogeographic relationships of isolates of *P. insidiosum* from different regions of Brazil and Thailand, using the analyses of sequences from Exo-1,3- β -Glucanase gene (*Exo1*). In this study, the phylogenetic relationships of a total of forty one isolates of *P. insidiosum* were established using four methods: Maximum parsimony (MP), Neighbor-joining (NJ), Maximum likelihood (ML), and Bayesian analysis (BA). The phylogeographic analyses involved evaluation of the nucleotide diversity, of polymorphism, of molecular variance (SAMOVA and AMOVA), the degree of genetic diversity (F_{ST}), and neutrality tests, which were performed with 31 *exo1* the DNA sequences of *P. insidiosum* with known geographical origin. Gene *exo1* proved to be a good phylogenetic and phytogeographic marker. The phylogenetic analysis formed three distinct groups compatible with the previous analysis with other markers. The analysis of the Thai isolates demonstrated its earliest origin over those Brazilians. Structuring patterns were observed in Brazilian isolates, suggesting a recent expansion of *P. insidiosum* in Brazil.

INTRODUCTION

Pythium insidiosum is the aquatic oomycete that causes pythiosis, a severe pyogranulomatous disease that mostly affects horses and humans and is present in tropical and subtropical regions (Gaastra et al., 2010). Most cases of human pythiosis occur in Thailand (Krajaejun et al., 2006a). Conversely, equine pythiosis is often reported in Brazil, mainly in Mato Grosso Pantanal and Rio Grande do Sul (Santurio et al., 2006).

Molecular phylogenetic analysis have allowed to relate *P. insidiosum* with other micro-organisms (Kwon-Chung, 1994) as well as to infer some patterns related to its diversification (Kammarnjesadakul et al., 2011, Azevedo et al., 2012), in order to understand its peculiarities. In this sense, it was shown that *P. insidiosum* appears to be subdivided into three major polytomous groups and that Thai isolates are paraphyletic in relation to Brazilian ones (Azevedo et al., 2012). The mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit II and sequences derived from ITS1, 5.8S rRNA and ITS2 rDNA (ITS) region are the markers most frequently used in these studies (Schurko et al., 2003; Kammarnjesadakul et al., 2011, Azevedo et al., 2012), though they may not represent the evolution of the entire genome once each gene has its own evolution rate. Thus, there is an explicit need reevaluate and deepen the study of these questions through the use of other independent genetic markers.

The *Exo-1,3-β-Glucanase (Exo1)* gene encodes an immunodominant protein putatively involved in cell wall remodeling (Krajaejun et al., 2006b), which has been pointed as a potential target for the development of diagnostic tests, as also as a candidate for immunotherapy (Krajaejun et al., 2010). Moreover, this gene also revealed to be informative for phylogenetic studies, and an evolutionary analysis of Thai isolates revealed the presence of two distinct groups with no correlation with either geographical distribution or clinical presentation (Krajaejun et al., 2010).

In the present study the phylogenetic and phylogeographic relationships of isolates of *P. insidiosum* from different regions of Brazil and Thailand were investigated, using the analyses of DNA parcial sequences from *Exo1*. Additionally, Gene *exo1* was characterized for Brazilian *P. insidiosum* isolates and had his phylogeographic characteristics compared to Thai isolates, in order to infer about the origin and diversification.

MATERIALS AND METHODS

P. insidiosum isolates and total DNA extraction

Sixteen isolates from different regions of Brazil and two standard stains (ATCC 58637 and CBS 119452) were used in phylogenetic and phylogeographic analysis (Table 1). The isolates were grown in 150ml *Sabouraud* broth (2% dextrose and 1% peptone) and incubated under agitation (120rpm) at 37°C. The mycelia were filtered

between 4 and 7 days, washed in sterile water and stored in a freezer at -80 ° C for at least 24h. Total DNA was extracted according to the protocol described by Möller et al. (1992) and modified by Klassen et al. (1996). The DNA concentrations were determined by spectrophotometry.

DNA amplification and sequencing

The primers for the PCR reaction were designed using the nucleotide sequence of *P. insidiosum* P24 peptide (GU994104.1) in Primer 3 and Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), and presented the following sequences: P24F (ACACGTCGATCAACTACGGTAACC) and P24R (TTTGCTTGACGTTGGAGCAGTC). All reactions were performed in a final volume of 25µl containing 20pm of each primer, 1.5 units of Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 200µM of each deoxynucleotide, 1.5mM MgCl₂, 1X of the 10X enzyme buffer, and 200ng of DNA sample. The amplification protocol was: 94 °C for 3 min, 30 cycles of 94 °C for 45s, 65 °C for 30s and 72 °C for 30s, followed by 72 °C for 10 min. PCR products were visualized in agarose gel 1% labeled with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. The PCR products that showed a single band of the desired length (900pb) were purified with PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen) and sequenced in an automatic sequencer (ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer) using the same primers described above.

Sequence assembly, download and alignment

The sequences were assembled and edited using the Staden package Gap 4 program (Staden, 1996). After confirming the identity of each contig by BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), these were aligned using the ClustalW algorithm, as implemented in Mega 6 (Tamura et al., 2013). Table 1 presents GenBank accession numbers for the 18 new *exo1* sequences obtained here, plus those of the 23 Thai isolates characterized by Krajaejun et al. (2010) and Keeratijarut et al. (2015). Geographic source of each isolate was also presented whenever possible. Additionally, Gene *exo1* sequences of *Phytophthora sojae*, *Ph. capsici*, *Ph. parasitica* and *Ph. infestans* were used as outgroup, since there is evidence that *Phytophthora sp.* is closely related to *Pythium sp.* (Villa et al., 2006).

Table 1: List of isolates of *Pythium* and *Phytophthora* species used in this study for Exo-1,3-β-Glucanase (*ExoI*) DNA coding sequences.

Species	Isolate	Source	Geographic origin	Geographic coordinates		GenBank accession no.
				Latitude	Longitude	
<i>P. insidiosum</i>	118	Equine	Jaguari	S 29° 29' 38.5595"	W 54° 42' 12.7069"	KU714523
<i>P. insidiosum</i>	121	Equine	Santa Maria	S 29° 41' 14.303"	W 53° 48' 55.7168"	KU739075
<i>P. insidiosum</i>	123	Equine	Cachoeira do Sul	S 30° 2' 0.5352"	W 52° 53' 35.8134"	KU739076
<i>P. insidiosum</i>	138	Equine	Corumbá	S 19° 0' 35.3624"	W 57° 39' 17.0806"	KU739084
<i>P. insidiosum</i>	178	Equine	Corumbá	S 19° 0' 35.3624"	W 57° 39' 17.0806"	KU739077
<i>P. insidiosum</i>	187	Equine	Jari	S 29° 17' 33.7945"	W 54° 13' 27.2748"	KU739078
<i>P. insidiosum</i>	210	Equine	Uruguaiana	S 29° 45' 42.8836"	W 57° 5' 9.0341"	KU739079
<i>P. insidiosum</i>	290	Equine	Santa Maria	S 29° 41' 14.303"	W 53° 48' 55.7168"	KU739080
<i>P. insidiosum</i>	291	Equine	Pelotas	S 31° 46' 33.7148"	S 31° 46' 33.7148"	KU739081
<i>P. insidiosum</i>	293	Equine	Rio Grande	S 32° 1' 59.5074"	W 52° 5' 55.0118"	KU739082
<i>P. insidiosum</i>	296	Equine	Pelotas	S 31° 46' 33.7148"	S 31° 46' 33.7148"	KU739083
<i>P. insidiosum</i>	135	Equine	Corumbá	S 19° 0' 35.3624"	W 57° 39' 17.0806"	KU840806
<i>P. insidiosum</i>	219	Equine	São Lourenço do Sul	S 31° 21' 46.2841"	W 51° 58' 43.8845"	KU840807
<i>P. insidiosum</i>	223	Equine	Cachoeira do Sul	S 30° 2' 0.5352"	W 52° 53' 35.8134"	KU840808
<i>P. insidiosum</i>	143	Equine	Corumbá	S 19° 0' 35.3624"	W 57° 39' 17.0806"	KU840809
<i>P. insidiosum</i>	232	Equine	Uruguaiana	S 29° 45' 42.8836"	W 57° 5' 9.0341"	KU840810
<i>P. insidiosum</i>	ATCC 58637	Equine	Costa Rica	-	-	KU840811
<i>P. insidiosum</i>	CBS 119452	Human	Thailand	-	-	KU840812
<i>P. insidiosum</i>	P1	Human	Bangkok	-	-	GU994090 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P2	Human	Lopburi	N 15° 2' 59.8459"	E 100° 53' 25.1156"	GU994091 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P3	Human	Chantaburi	N 12° 47' 52.4231"	E 102° 9' 47.7785"	GU994092 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P6	Human	Nan	N 18° 46' 32.2745"	E 100° 46' 22.9501"	GU994093 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P7	Human	Ayuthaya	N 14° 21' 11.6489"	E 100° 34' 8.283"	GU994094 ^a

(continuation)

<i>P. insidiosum</i>	P9	Human	Lumpang	S 6° 21' 25.002"	E 106° 32' 37.2336"	GU994095 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P10	Human	NA	-	-	GU994096 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P11	Human	Saraburi	N 14° 31' 43"	E 100° 54' 41"	GU994097 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P15	Human	Yasothon	N 15° 47' 33.5076"	E 104° 8' 43.0177"	GU994098 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P16	Human	Saraburi	N 14° 31' 43"	E 100° 54' 41"	GU994099 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P17	Human	Chonburi	N 13° 21' 40"	E 100° 59' 6"	GU994100 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P19	Human	NA	-	-	GU994101 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P20	Human	NA	-	-	GU994102 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P22	Human	Patomthani	N 14° 1' 15.0208"	E 100° 31' 30.0994"	GU994103 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P24	Human	Supanburi	N 14° 28' 28.1611"	E 100° 7' 3.7661"	GU994104 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P25	Human	Nakornpatom	N 13° 58' 44.0004"	E 100° 10' 13.1725"	GU994105 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P27	Human	NA	-	-	GU994106 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P28	Human	NA	-	-	GU994107 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P29	Human	NA	-	-	GU994108 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P30	Human	Rachaburi	N 13° 31' 41.8415"	E 99° 48' 48.316"	GU994109 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P32	Human	NA	-	-	GU994110 ^a
<i>P. insidiosum</i>	P40	Human	Pichit	N 16° 11' 13.9268"	E 100° 20' 59.2422"	GU994111 ^a
<i>P. insidiosum</i>	Pi-S	Human	-	-	-	LC033487 ^b
<i>Phytophthora sojae</i>	P6497	Unknown	-	-	-	XM_009541535 ^c
<i>Phytophthora capsici</i>	CBOT129-H24	Unknown	-	-	-	BT032091
<i>Phytophthora parasitica</i>	INRA-310	Unknown	-	-	-	XM_008895332 ^c
<i>Phytophthora infestans</i>	-	Unknown	-	-	-	AF494014 ^d

^a Krajaejun et al. 2010^b Keeratijarut et al. 2015^c Tyler et al. 2006^d McLeod et al., 2003

Analysis of selection pressures

A codon-based Z test was first performed in Mega 6 in order to check the probability of rejecting the null hypothesis of strict neutrality ($dN=dS$) in favor or the alternative hypothesis of positive selection ($dN>dS$) for each pairwise comparison. In this case, dS and dN are the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions per synonymous and nonsynonymous sites, respectively. After this, the strength of the selection pressure operating in each codon of the alignment was also evaluated in this software using the likelihood-based approach implemented in HyPhy (Pond et al. 2005). The models employed were Nei and Gojobori (1986) and Felsenstein (1981), respectively.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis of the *exo1* sequences were reconstructed using four different methods: by Maximum Parsimony (MP), in Paup 4.0a146 (Swofford, 2003), using and equal weighting strategy; by Neighbor Joining (NJ), in Paup, according to the GTR + G model suggested by the AIC Test (Akaike, 1974) performed in j.ModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012); by Maximum Likelihood (ML), in PhyML 3.1 (Guindon and Gascuel, 2003), using the GTR + G model; by Bayesian Analysis (AB), in MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001), using the GTR + G model. MP trees were inferred by heuristic search, with Tree Bisection and Reconnection branch swapping applied to a set of 100 random stepwise addition starting trees in each of 1.000 bootstrap (BO) replicates. Bootstrap was also used to measure support in NJ and ML analysis. For BA, clade support was evaluated through the respective posterior probabilities values, obtained from a set of 10,000,000 generations of Markov Chain Monte Carlo (MCMC) search sampled every 1,000, after discarding 25% of the initial results as burn-in.

Phylogeographic analysis

Phylogeographic analysis was applied to the reduced set of 31 *exo1 P. insidiosum* sequences (Table 1) for which information about precedence could be confidently obtained. As several of these sequences presented unphased polymorphic sites, haplotypes were first reconstructed using PHASE algorithm (Stephens et al. 2001; Stephens and Donnelly 2003), as implemented by DNAsp 5.10 (Librado and Roza, 2009).

After this, nucleotide diversity [number of polymorphic loci, number of substitutions (transitions and transversions), number of private substitution sites, mean expected heterozygosity and π], as well as neutrality [Tajima's D (Tajima, 1989) and Fu's F_S (Fu, 1997)] were evaluated in Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier and Lischer, 2010). This software was also employed in order to measure the differentiation levels (F_{ST}) presented among *P. insidiosum* isolate sources, or groups of sources, with significance measured through 10,000 permutations.

Finally, population groupings were assessed through a Spatial Analysis of Molecular Variance (SAMOVA) (Dupanloup et al., 2002), with 100 simulated annealing processes. In

this case, different hypothesis were evaluated through hierarchical Analysis of Molecular Variance (AMOVA) in Arlequin, using pairwise differences with 10,000 permutations.

RESULTS

In this study, we analyzed selective pressures, as well as phylogenetic patterns for a set of 41 *Pythium insidiosum exo1* sequences sampled in different regions from Thailand (n=24), Brazil (n=16) and Costa Rica (n=1). This matrix was further reduced to 31 sequences in the phylogeographic analysis, since we were not able to infer origin for ten of the included isolates. In both cases, 840 positions were included in the final dataset.

Neutrality

All dN – dS values measured in the pairwise comparisons between sequences presented negative values, indicating a predominance of synonymous substitutions in our dataset. In this sense, the codon-based z test of positive selection did not detect any comparison for which strict neutrality (dN = dS) could be rejected in favor of the alternative hypothesis (dN > dS). Even though the maximum likelihood analysis of selection presented positive dN – dS values for eight of the 280 evaluated codons, none of these was statically significant. The absence of significant signs of positive selection in the set of analyzed sequences further endorses their use in the assessment of *P. insidiosum* phylogenetic and phylogeographic patterns (Castoe et al., 2009, Larmuseau et al., 2010).

Phylogenetic analysis

The phylogenetic trees recovered through the four different methods were quite congruent (results not shown), and all of them supported the presence of three highly supported and completely polytomous clades (PP values ≥ 0.99 ; BO values ≥ 85) (Figure 1): (1) the first encompassing seven of the Thai isolates; (2) the second grouping the other 17 Thai isolates; (3) the third presenting the 16 sampled Brazilian isolates and the ATCC 58637 which is from Costa Rica. This evolutionary subdivision of Thai isolates is devoid of any geographic structure, and a single locality (Saraburi) presents isolates grouped in clades 2 and 3 (P11, and P16, respectively). Even though, *P. insidiosum* found in this country is clearly paraphyletic in regard to the Brazilian ones (PP = 1.00; BO = 99, 95 and 84 for ML, MP and NJ, respectively) (Figure 1).

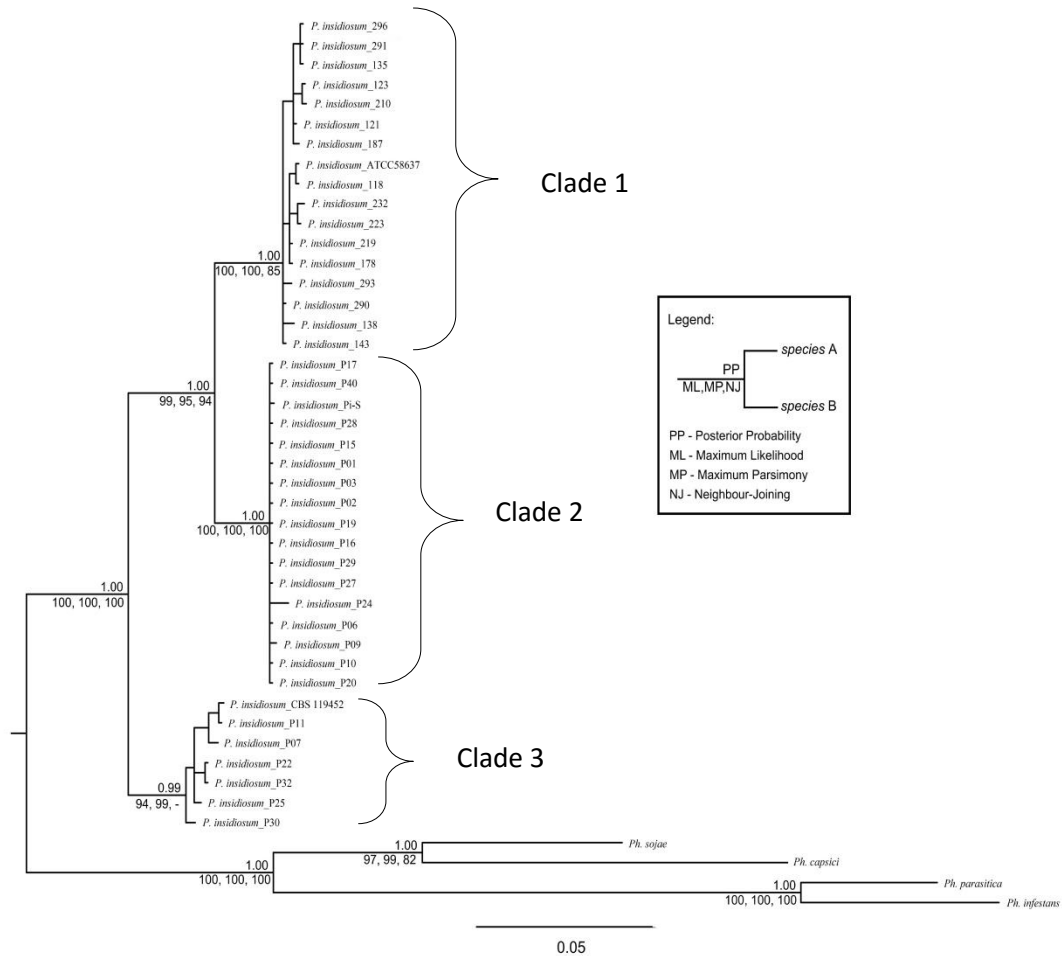


Figure 1: Phylogenetic relationship among the examined *Pythium insidiosum* isolates inferred by posterior probability (PP), maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), and Neighbor-Joining (NJ) analyses based on *Exo-1,3-β-Glucanase* gene. The numbers along branches indicate bootstrap values and posterior probabilities resulting from different analyses in the order: PP/ML/MP/NJ.

Phylogeographic analysis

In accordance to the phylogenetic tree, molecular diversity indices presented by the Thai isolates were at least five times higher than those found in Brazil (Table 2). When this analysis was performed per sampling locality, as expected, the region of Saraburi presented the higher diversity values ($\pi = 35.167$) (Supplementary Material – Table S1). Molecular diversity indices for Brazilian localities were commonly lower than for the Thai ones, and Corumbá, a city in Pantanal Mato-grossense, revealed to possess the most diverse array of *P. insidiosum* isolates (10 substitution sites), at least when our sample is concerned.

Table 2: Results of diversity analysis

Molecular diversity indices	Brazil	Thailand	Mean	s.d.
No. of polymorfism loci	13	73	43	42.426
Mean expected heterozygosity	0.04521	0.26352	0.15436	0.15437
s.d. expected heterozygosity	0.12721	0.20256	0.16488	0.05328
No. of transitions	9	43	26	24.042
No. of transversions	4	33	18.5	20.506
No. of substitutions	13	76	44.5	44.548
No. private subst. Sites	7	67	37	42.426
Pi	4.159	24.244	14.20148	14.20182

No.: number

s.d.: standard deviation

Pi: Nucleotide diversity

Despite the sharp phylogeographic structure detected among the three clades in the phylogenetic tree, 228 of the 253 pairwise F_{ST} values were nonsignificant (Supplementary Material – Table S2), probably as a result of sampling shortages. In this case, most of the significant comparisons were recovered with Corumbá, which has the higher sampling size. Even so, it is important to emphasize that besides the differentiation of Corumbá region in regard to any of the Thai localities, this region was also moderately differentiated from four of the other eight Brazilian sampling points. Significant differentiation was also found between Brazilian isolates sampled at two points located at the center of the state of Rio Grande do Sul (Santa Maria x Cachoeira do Sul), which are only 125 km distant.

The SAMOVA performed with the input of three groups of populations presented almost the same geographic structure as the phylogenetic tree, except that Saraburi, which presented isolates grouped with clades 2 (Thai 1) and 3 (Thai 2) of the tree, was joined by SAMOVA with the other localities presenting isolates branching in clade 3 (Figure 2). Considering these three groups of populations, the AMOVA indicated that 80.82% of the observed variation was detected among groups (Table 3). The structure among these three groups of populations was also strong (Table 4), and the two groups of Thai populations were as strongly differentiated between each other ($F_{ST \text{ Thai1} \times \text{Thai2}} = 0.76$) as those encountered in different continents ($F_{ST \text{ Bra} \times \text{Thai2}} = 0.78$).

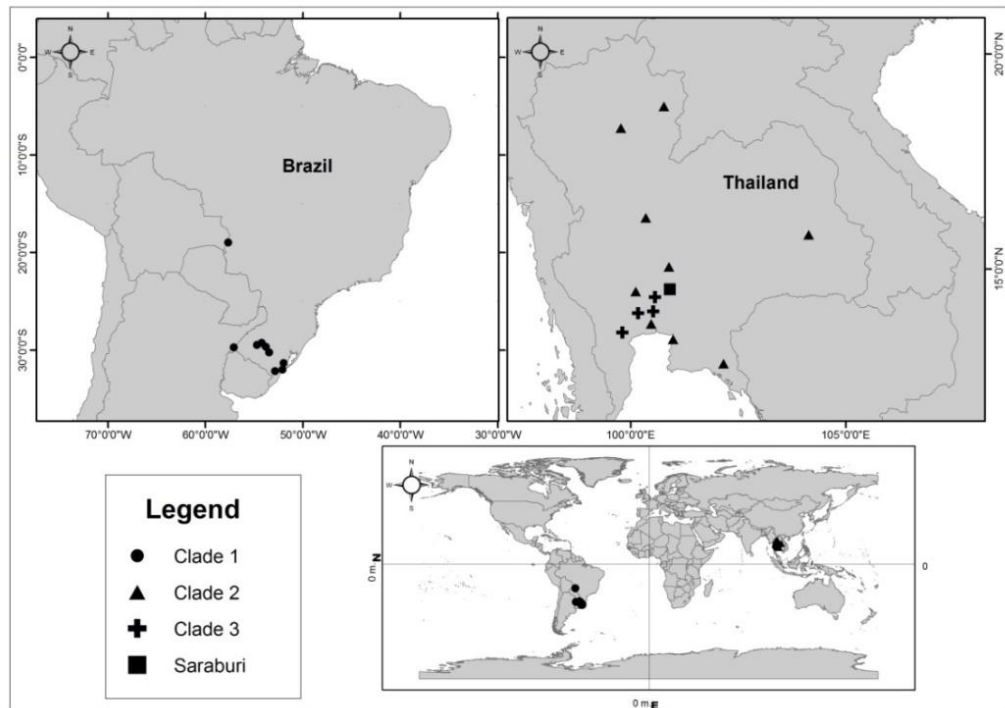


Figure 2: Map of locations sampled for Brazil and Thailand for analysis of genetic diversity. The symbols represent the structure observed in AMOVA. Saraburi is identified with a different symbol once has isolates in both clade 2 and 3.

Table 3: Analysis of molecular variance (AMOVA) for populations of *P. insidiosum* from three groups of localities based on *exo1* sequences.

Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	2	588.138	15.75143 Va	80.82
Among populations within groups	20	107.935	1.00103 Vb	5.14
Within populations	39	106.750	2.73718 Vc	14.04
Total	61	802.823	19.48964	

d.f: Degrees of freedom

Table 4: Pairwise F_{ST} values for the three populations obtained in the AMOVA.

	Brazil	Brazil	Thai 1	Thai 2
Thai 1	0.90755*		0	
Thai 2	0.78131*	0.75687*		0

* Significant values

Finally, these three groups of populations were also evaluated in regard to the neutrality tests. Although Tajima's D test repeatedly presented nonsignificant results, Fu's F_s recovered a significant negative value for the Brazilian group (Table 5).

Table 5: Results of neutrality tests (Tajima's D and Fu's F_s).

	Brazil	Thai1	Thai2	Mean	s.d.
D de Tajima					
Tajima's D	0.94007	-0.65032	-1.33207	-0.34744	1.16596
Tajima's D p-value	0.875	0.281	0.082	0.41267	0.41257
FS de Fu					
FS	-10.752	0.13087	1.02585	-3.19842	6.55687
FS p-value	0	0.504	0.7	0.40133	0.36112

s.d.: standard deviation

DISCUSSION

Many studies demonstrate that geographic and phenotypic variations within or between populations of oomycetes, including the variation of pathogenicity and host differences may be identified by molecular markers (Nyasse et al., 1999; Li et al., 2012). Additionally, molecular markers may also help to shed some light into the evolutionary history presented by different pathogenic microorganisms (Tamura et al., 2002; Merseguel et al., 2015; Rangel-Gamboa et al., 2015). The phylogenetic relationships among isolates of *P. insidiosum* are usually studied with the use of nucleotide sequences of the mitochondrial gene that encodes the protein cytochrome c oxidase subunit II (COX II) and/or the nuclear ITS region (Schurko et al., 2003; Kammarnjesadakul et al., 2011; Azevedo et al., 2012). However, as different markers may present different evolutionary histories, not necessarily congruent with the species history (Rokas et al., 2003, Kuramae et al., 2007, Shan & Gras, 2010), other regions of the DNA need to be studied in order to better characterize the evolution of *P. insidiosum* from different geographic regions while trying to understand their evolutionary characteristics.

Exo1 gene of *P. insidiosum* has 2,229pb that encode the exo-1,3- β -glucanase protein with has 742 amino acid sequence and present two conserved domains, BglC and X8 superfamily which are involved in carbohydrate transport, binding, and metabolism (Keeratijarut et al., 2015). This protein has been considered a potential target for the development of diagnostic tests and immunotherapy (Krajaejun et al., 2006b), although previous attempts to correlate its variation with either geographic or clinical presentations did not reveal significant results (Krajaejun et al., 2010). Even so, Krajaejun et al. (2010) showed that *exo1* sequences were able to differentiate the two clades of *P. insidiosum* previously assigned to Thailand (Schurko et al., 2003; Kammarnjesadakul et al., 2011), a country where pythiosis is a human health problem (Krajaejun et al., 2006a, Krajaejun et al., 2008). As Brazilian isolates of *P. insidiosum* are mainly associated with equine pythiosis (Leal et al.,

2001, Santos et al., 2014), and as cell-wall components may be related with host shifts in different microorganisms (Li et al., 1999, Anderson et al., 2016), the comparative characterization of *exo1* for these isolates was considered an interesting task.

Although the performed selection tests did not detect any significant sign of positive selection either between Brazilian and Thai isolates or within individual codons of *Exo1*, the region here characterized encompasses only about 37% of the coding region of the gene. In this sense, other regions coding for different domains, as BglC and X8, may be potential targets for future studies. Additionally, recently the complete genome of *P. insidiosum* was sequenced, allowing the emergence of new potential genes for further studies, including phylogeny and phylogeography (Ascunce et al., 2015).

Probably linked to the absence of directional selection pressures in *Exo1*, this marker was able to reveal interesting patterns related to the evolution of *P. insidiosum*. In this sense, although the paraphyletic status of Thai isolates in regard to Brazilian ones was previously suggested by our research group (Azevedo et al., 2012), here this is the first time that this result is significantly supported. In fact, the phylogenetic tree recovered supports Neotropical isolates of *P. insidiosum* as derived in regard to Asian ones. The performed structure, diversity and neutrality evaluations also helped to clarify this fact and other aspects of the present evolutionary scenario.

In addition, the subdivision proposed by SAMOVA, and supported by classic F_{ST} statistics, presents almost the same structure observed in the phylogenetic tree. Furthermore, the AMOVA was able to show that nearly 81% of the encountered variation in *exo1* is explained by the subdivision among two Thai and one Brazilian group, suggesting this as an ancient structure. The lower diversity values and the recent expansion signs detected for the Brazilian isolates of *P. insidiosum* support that they are derived from the Asian clusters. This structure also was previously suggested by Azevedo et al. (2012). Nevertheless, the incipient signs of differentiation between Brazilian isolates located far apart or not suggest that this scenario is even more complex than suggested by this first approach.

Therefore, although *exo1* may not explain the host shifts observed for *P. insidiosum*, it was able to clarify the evolutionary patterns related with this property, revealing this as an important marker to the study of phylogeny and phylogeography of this pathogen. The inclusion of isolates from these and other regions of the world and the addition of a temporal perspective to these analyses will certainly help to deepen the knowledge related to the evolution of this important and still poorly known microorganism. Nevertheless, given the shortages related to sampling and to the calibration of molecular clock rates, this study certainly represents an important first step to understand the epidemiology and evolution of *P. insidiosum*.

REFERENCES

Anderson, J.P., Hane, J.K., Stoll, T., Pain, N., Hastie, M., Kaur, P., Hoogland, C., Jeffrey Gorman, J., Singh, K.B., 2016. Proteomic analysis of *Rhizoctonia solani* identifies infection-specific, redox associated proteins and insight into adaptation to different plant hosts. Mol. Cell. Proteomics.

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control.* 19, 716–723.
- Ascunce, M.S., Huguet-Tapia, J.C., Braun, E.L., Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, N.O., Goss, M.G., 2015. Whole genome sequence of the emerging oomycete pathogen *Pythium insidiosum* strain CDCB5653 isolated from an infected human in the USA. *Genom. Data* 7, 60–61.
- Azevedo, M.I.; Botton, S.A., Pereira, D.I.B., Robe, L.J., Jesus, F.P.K., Mahl, C.D., Costa, M.M., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2012. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. *Vet. Microbiol.* 159, 141–8.
- Castoe, T.A., 2009. Evidence for an ancient adaptive episode of convergent molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 8986–8991.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9, 772.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L., 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11, 2571–2581.
- Excoffier, L., Lischer, H.E., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
- Gaastra, W., Lipman, L.J.A., De Cock, A.W.A.M., Exel, E.T., Pegge, R.B.G., Scheurwater, R.V., Mendoza, L., 2010. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet. Microbiol.* 146, 1–16.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. Bayes–Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Kammarnjesadakul, P., Palaga, T., Sritunyalucksana, K., Mendoza, L., Krajaejun, T., Vanittanakom, N., Tongchusak, S., Denduangboripant, J., Chindamporns, A., 2011. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). *Med. Mycol.* 49, 289–295.
- Keeratijarut, A., Lohnoo, T., Rujirawat, T., Yingyong, W., Kalambaheti, T., Miller, S., Phuntumart, V., Krajaejun, T., 2015. The Immunoreactive Exo-1,3- β -Glucanase from the Pathogenic Oomycete *Pythium insidiosum* Is Temperature Regulated and Exhibits Glycoside Hydrolase Activity. *PLoS ONE*, 10.

- Klassen, G.R., Balcerzak, M., De Cock, A.W.A.M., 1996. 5S ribosomal RNA gene spacer as species specific probes for eight species of *Pythium*. *Phytopathology* 86, 581–587.
- Kwon-Chung, K.J., 1994. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. *Clin. Infect. Dis.* 19, S1–7.
- Krajaejun, T., Sathapatayavongs, B., Chaiprasert, A., Srimuang, S., 2008. Do You Know Human Pythiosis? *J. Infect. Dis. Antimicrob. Agents* 25, 45–51.
- Krajaejun, T., Keeratijarut, A., Sriwanichrak, K., Lowhnoo, T., Rujirawat, T., Petchthong, T., Yingyong, W., Kalambaheti, T., Smittipat, N., Juthayothin, T., Sullivan, T.D., 2010. The 74-kilodalton immunodominant antigen of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* is a putative exo-1,3-beta-glucanase. *Clin. Vaccine. Immunol.* 17, 1203–1210.
- Krajaejun, T., Sathapatayavongs, B., Prachartam, R., Nitiyanant, P., Leelachaikul, P., Wanachiwanawin, W., Chaiprasert, A., Assanasen, P., Saipetch, M., Mootsikapun, P., Chetchotisakd, P., Lekhakula, A., Mitarnun, W., Kalnauwakul, S., Supparatpinyo, K., Chaiwarith, R., Chiewchanvit, S., Tananuvat, N., Srisiri, S., Suankratay, C., Kulwichit, W., Wongsaisuwan, M., Somkaew, S., 2006. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin. Infect. Dis.* 43, 569–76.
- Kuramae, E.E., Robert, V., Echavarri-Erasun, C., Boekhout, T., 2007. Cophenetic correlation analysis as a strategy to select phylogenetically informative proteins: an example from the fungal kingdom. *BMC Evol. Biol.* 7
- Larmuseau, M.H.D., Huysse, T., Vancampenhout, K., Van Houdt, J.K.J., Volckaert, P.A.M., 2010. High molecular diversity in the rhodopsin gene in closely related goby fishes: A role for visual pigments in adaptive speciation? *Mol. Phyl. Evol.* 55, 689–698.
- Leal, A.B.M., Leal, A.T., Santurio, J.M., Kommers, G.D., Catto, J.B., 2001. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. *Pesq. Vet. Bras.* 21, 151–156.
- Li, T., Johansson, I., Hay, D.I., Strömberg, N., 1999. Strains of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces viscosus* Exhibit Structurally Variant Fimbrial Subunit Proteins and Bind to Different Peptide Motifs in Salivary Proteins. *Infect. Immun.* 67, 2053–2059.
- Li, P., Cao, S., Dai, Y.L., Li, X.L., Xu, D.F., Guo, M., Pan, Y.M., Gao, Z.M., 2012. Genetic diversity of *Phytophthora capsici* (*Pythiaceae*) isolates in Anhui Province of China based on ISSR-PCR markers. *Genet. Mol. Res.* 11, 4285–4296.
- Librado, P., Roza, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–2.
- McLeod, A., Smart, C.D., Fry, W.E., 2003. Characterization of 1,3-b-glucanase and 1,3;1,4-b-glucanase genes from *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.* 38, 250–263.

- Merseguel, K.B., Nishikaku, A.S., Rodrigues, A.M., Padovan, A.C., Ferreira R.C., de Azevedo Melo, A.S., Briones, M.R., Colombo, A.L., 2015. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infect. Dis.* 15.
- Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandemann, H., Geiger, H.H., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 20, 6115–6116.
- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418–426.
- Nyasse, S., Grivet, L., Risterucci, A.M., Blaha, G., Berry, D., Lanaud, C., Despreaux, D., 1999. Diversity of *Phytophthora megakarya* in Central and West Africa revealed by isozyme and RAPD makers. *Mycol. Res.* 103, 1225–1234.
- Pond, S.L.K., Frost, S.D.W., Muse, S.V., 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21, 676–679.
- Rangel-Gamboa, L., Martínez-Hernandez, F., Maravilla, P., Arenas-Guzmán, R., Flisser, A., 2015. Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii sensu lato*. *Med. Mycol.*
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N., Carroll, S.B., 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425, 798–804.
- Santos, C.E.P, Ubiali, D.G., Pescador, C.A., Zanette, R.A., Santurio, J.M., Marques, L.C., 2014. Epidemiological Survey of Equine Pythiosis in the Brazilian Pantanal and Nearby Areas: Results of 76 Cases. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 270–274
- Santurio, J.M., Alves, S.H., Pereira, D.B., Argenta, J.S., 2006. Pitiose: uma micose emergente. *Act. Sci. Vet.* 34, 1-14.
- Schurko, A.M., Mendoza, L., Lévesque, A.C., Désaulniers, N.L., De Cock, A.W.A.M., Klassen, G., 2003. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycol. Res.* 107, 537–544.
- Shan, Y., Gras, R., 2010. Genome-wide EST data mining approaches to resolving incongruence of molecular phylogenies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 680, 237–243.
- Staden, R., 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5, 233–241.
- Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 978–89.
- Stephens, M., Donnelly, P., 2003. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1162–1169.
- Swofford, D. L., 2003. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts.

- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Tamura, M., Kasuga, T., Watanabe, K., Katsu, M., Mikami, Y., Nishimura, K. 2002. Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS region sequences, including two new strains from Thai and Chinese patients in Japan. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 43, 11–19.
- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H.Y., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J.L., Chapman, J., Damasceno, C.M.B., Dorrance, A.E., Dou, D., Dickerman, A.W., Dubchak, I.L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S.G., Govers, F., Grunwald, N.J., Huang, W., Ivors, K.L., Jones, R.W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K.H., Lee, M.-K., McDonald, W.H., Medina, M., Meijer, H.J.G., Nordberg, E.K., Maclean, D.J., Ospina-Giraldo, M.D., Morris, P.F., Phuntumart, V., Putnam, N.H., Rash, S., Rose, J.K.C., Sakihama, Y., Salamov, A.A., Savidor, A., Scheuring, C.F., Smith, B.M., Sobral, B.W.S., Terry, A., Torto-Alalibo, T.A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., Boore, J.L., 2006. *Phytophthora* Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis. *Science*, 313, 1261–1266, 2006.
- Villa, N.O., Kageyama, K., Suga, H., 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and b-tubulin gene sequences. *Mycologia* 98, 10–422, 2006.

Supplementary Table S 1: F_{ST} values per location

Location	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0										
2	0.04035	0									
3	0.03485	-0.11111	0								
4	0.03827	0	-0.3	0							
5	0.07035	0	-0.08333	0	0						
6	0.09658	0.2	0.07692	0.15385	-0.83333	0					
7	0.04877	-0.2	-0.11111	-0.125	0.18182	0.33333	0				
8	0.06792	0.4	0	0	0	0.28571	0.4	0			
9	0.18336	0.72727	0.46154	0.625	0.5	0.61538	0.8	1	0		
10	0.05115	0	0	0	0.25	0.44444	0	1	1	0	
11	0.41123	0.95385	0.89552	0.90909	0.90323	0.92063	0.95385	1	1	1	0
12	0.54154*	0.90625	0.87739	0.88361	0.87988	0.88998	0.90625	0.92445	0.93531	0.9269	0.52941
13	0.56463*	0.92947	0.90159	0.90779	0.90201	0.9115	0.92947	0.94834	0.95542	0.94993	0.58893
14	0.64609*	0.88137*	0.86746*	0.86992*	0.86528*	0.87194*	0.88137*	0.88583*	0.90184*	0.88944*	0.20567
15	0.41773	0.95385	0.89552	0.90909	0.90625	0.92308	0.95385	1	1	1	1
16	0.55299*	0.90159	0.87472	0.88049	0.87314	0.88296	0.90159	0.91817	0.9292	0.92064	0.48308
17	0.5496*	0.9153	0.88669	0.89293	0.89126	0.90086	0.9153	0.93388	0.94326	0.936	0.72414
18	0.40459	0.95238	0.89231	0.90625	0.90323	0.92063	0.95238	1	1	1	1
19	0.38722	0.90625	0.84848	0.86154	0.85246	0.87097	0.90625	0.94915	0.95652	0.95082	0.4
20	0.06003	0.87368	0.83158	0.84211	0.84848	0.86	0.87368	0.90426	0.91176	0.90426	0.91509
21	0.15048	0.96703	0.92391	0.93407	0.93684	0.94792	0.96703	1	1	1	1
22	0.10749	0.92135	0.87778	0.88764	0.89247	0.90426	0.92135	0.95455	0.95918	0.95455	0.96
23	0.15048	0.96629	0.92222	0.93258	0.93548	0.94681	0.96629	1	1	1	1

* Significant values

1 Saraburi
2 Bangkok
3 Lopburi
4 Chantaburi
5 Nan
6 Lumpang

7 Yasothon
8 Chonburi
9 Supanburi
10 Pichit
11 Jaguari
12 Santa Maria

13: Cachoeira
14: Corumbá
15 Jari
16 Uruguaiana
17 Pelotas
18 Rio Grande

19 São Lourenço do Sul
20 Ayuthaya
21 Patomthani
22 Nakornpatom
23 Rachaburi

Supplementary Table S 1: F_{ST} values per location (continuation)

Location	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12	0											
13	0.31111*	0										
14	0.01498	0,20974*	0									
15	0.19101	0,63509	0,15789*	0								
16	0.25714	-0.07937	0.24924*	0.42662	0							
17	0.29167	0.59722*	0.35135*	0.38462	0.48611*	0						
18	0.19101	0.63509	0.28662	1	0.52941	0.61905	0					
19	0.14286	0.25123	0.04062	0.4	0.04846	0.44654	0.66667	0				
20	0.91377	0.92805	0.91115*	0.91509	0.91093	0.9189	0.91346	0.88679	0			
21	0.95591	0.96917	0.93208*	1	0.95101	0.96098	1	0.97059	0.52632	0		
22	0.93455	0.94886	0.9198*	0.96	0.93056	0.93985	0.95918	0.93	0.35	0.6	0	
23	0.95316	0.96731	0.92788*	1	0.9481	0.95855	1	0.96875	0.52632	1	0.6	0

*Significant values

1 Saraburi
2 Bangkok
3 Lopburi
4 Chantaburi
5 Nan
6 Lumpang

7 Yasothon
8 Chonburi
9 Supanburi
10 Pichit
11 Jaguari
12 Santa Maria

13: Cachoeira
14: Corumbá
15 Jari
16 Uruguaiana
17 Pelotas
18 Rio Grande

19 São Lourenço do Sul
20 Ayuthaya
21 Patomthani
22 Nakornpatom
23 Rachaburi

Supplementary Table S 2: Results of diversity analysis per location

Statistics	Location													
	Brazil						Thailand							
	Santa Maria	Cachoeira do Sul	Corumbá	Uruguaiiana	Pelotas	São Lourenço do Sul	Saraburi	Bangkok	Lopburi	Chantaburi	Nan	Ayuthaya	Lumpang	Yasothon
No. transitions	4	4	7	5	2	3	27	2	6	6	5	7	4	2
No. transversions	1	0	3	1	2	0	30	1	1	0	1	2	1	1
No. substitutions	5	4	10	6	4	3	57	3	7	6	6	9	5	3
No. indels	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. transitions sites	4	4	7	5	2	3	26	2	6	6	5	7	4	2
No. transversions sites	1	0	3	1	2	0	30	1	1	0	1	2	1	1
No. substitution sites	5	4	10	6	4	3	56	3	7	6	6	9	5	3
No. private substitution sites	0	0	3	0	0	0	34	0	1	2	1	0	0	1
No. indel sites	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pi	3	2.167	4	3.5	2.667	3	35.167	3	7	6	6	9	5	3
Theta_S	2.72727	2.18182	3.85675	3.27273	2.18182	3	30.54545	3	7	6	6	9	5	3
s.d. Theta_S	1.78962	1.48968	1.98624	2.08754	1.48968	2.44949	16.75677	2.44949	5.2915	4.58258	4.58258	6.7082	3.87298	2.44949
Theta_pi	3	2.16667	4	3.5	2.66667	3	35.16667	3	7	6	6	9	5	3
s.d. Theta_pi	2.34521	1.78975	2.54484	2.6762	2.12374	3.4641	23.37258	3.4641	7.48331	6.48074	6.48074	9.48683	5.47723	3.4641

No.: number

s.d.: standard deviation

CAPÍTULO 2

In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese and zinc

Artigo submetido à Mycopathologia

Title: *In vitro* susceptibility of the oomycete *Pythium insidiosum* to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese or zinc

Authors: Tatiana Corrêa Ribeiro¹, Carla Weiblen², Sônia de Avila Botton², Daniela Isabel Brayer Pereira³, Francielli Pantella Kunz de Jesus¹, Camila Marina Verdi¹, Leticia Trevisan Gressler², Janio Morais Santurio^{1#}

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

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

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

#Address for correspondence:

Janio M. Santurio

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima nº 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: janio.santurio@gmail.com

Abstract

Pythium insidiosum is an aquatic oomycete that causes pythiosis, a disease of difficult treatment that affects domestic and wild animals. This infection is often described in horses in Brazil and humans in Thailand. Here, we tested *in vitro* activities of metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese or zinc against 23 isolates of the oomycete *P.*

insidiosum. The assays were performed by broth microdilution based on CLSI M38-A2 document. The minimum inhibitory and fungicidal concentrations were established for all isolates. Copper acetate and cadmium acetate showed the highest inhibitory effects, with minimal inhibitory concentration ranging from 4-64 µg/mL and 16-256 µg/mL, respectively. The mean geometric for minimal fungicidal concentrations were respectively 26.71mg/L and 111.43mg/L for copper acetate and cadmium acetate. These results suggest that copper and cadmium can inhibit *P. insidiosum* growth, highlighting the greater inhibitory activity of copper acetate. In addition, this study proposes that copper and/or cadmium compounds can be used in upcoming researches to formulate effective drugs against *P. insidiosum*.

Keywords: oomycetes, susceptibility test, copper, metals, cadmium.

Introduction

Pythiosis is a chronic granulomatous disease caused by the aquatic oomycete *Pythium insidiosum* [1]. The disease has been described to affect horses in Brazil in marshy regions such as the Pantanal and Rio Grande do Sul [2-4]. In humans, a large number of cases of the disease has been reported in Thailand [5].

The therapies commonly used to treat animal pythiosis include surgery, chemotherapy and immunotherapy, either alone or in combination [6-10]. However, in clinical practice, we have observed many cases that do not respond to these therapies, demonstrating the need to research alternative therapeutic approaches.

To this end, studies employing metal compounds in combination with antimicrobial agents have been explored as a promising alternative. Antimicrobials complexed with metal compounds exhibit greater activity than free drugs [11]. Due to the difficulties encountered in the treatment of pythiosis, this study aimed to evaluate *in vitro* antimicrobial potential of

metal compounds containing cadmium, lead, copper, manganese and zinc against *P. insidiosum*.

Materials and methods

Pythium insidiosum isolates and

Twenty-one Brazilian clinical isolates of *P. insidiosum* obtained from horses with pythiosis and two standard strains (ATCC 58637 and CBS 101555) were included in this study. The microorganisms were isolated from infected tissues of animals, and the cultures were maintained in Corn Meal Agar (CMA) at 37°C. All clinical isolates were previously identified by morphological analysis as well as polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing of Internal Transcribed Spacer region of ribosomal DNA (ITS region).

Metallic compounds, inoculum preparation and *in vitro* susceptibility test

In this experiment, broth microdilution methodology based on the Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 document [12] adapted by Pereira et al. [7] was used. Cadmium acetate, lead acetate, copper acetate, manganese acetate, zinc acetate and zinc sulfate were commercially obtained. The compounds were diluted in Milli-Q water to perform the stock solutions. From these solutions, serial dilutions were performed in RPMI medium, and the tested concentrations ranged from 0.5 µg/mL to 256 µg/mL. The inoculums were prepared as described by Pereira et al. [7]. In each microdilution plate well, 100 µL of each metallic compound dilution was added to an equal volume of inoculum. A positive control (100 µL RPMI plus 100 µL inoculum) and a negative control (100 µL RPMI plus 100 µL metallic compound dilution) were prepared for all samples. All tests were performed in triplicate. The results were read after 48 h of incubation, and the visual presence or absence of hyphae was observed. The lowest metallic compound concentration capable of inhibiting

microorganism growth in the positive sample was considered the minimal inhibitory concentration (MIC). The minimum fungicidal concentration (MFC) was determined by transferring 0.1 mL of a metallic compound at a concentration equal to or higher than the MIC standard to test tubes containing 0.9 mL Sabouraud broth. After a 96 h incubation period at 37 °C, the lowest metallic compound concentration that did not exhibit growth was considered the MFC.

Results

This is the first study to evaluate the antimicrobial activity of metallic compounds of copper, cadmium, lead, manganese, and zinc against *P. insidiosum*. The results of *in vitro* susceptibility of *P. insidiosum* isolates tested are listed in Table 1.

Copper acetate showed the best inhibitory effect against isolates of *P. insidiosum*, with MIC ranging from 4 to 64 µg/mL. Additionally, the MIC₅₀ and MIC₉₀ values were respectively 8 and 64 µg/mL. The other metallic compound with inhibitory activity against *P. insidiosum* isolates was cadmium acetate. For this compound, MIC ranged from 16 to 256 µg/mL, and the MIC₅₀ and MIC₉₀ values were 128 and 256 µg/mL, respectively.

We observed that the compounds lead acetate, manganese acetate, zinc acetate and zinc sulfate were not able to inhibit *P. insidiosum* isolates at the tested concentrations.

Discussion

Infections caused by *P. insidiosum* respond poorly to chemotherapy, requiring the use of immunotherapy or surgical excision and, in many cases, a combination of more than one therapeutic method [9]. The search for new therapeutic approaches is encouraged by the reduced susceptibility of *P. insidiosum* to available drugs because this microorganism has no ergosterol, the component target of most available antifungals [8], in its cytoplasmic

membrane. In this regard, complexing metallic compounds to antimicrobials appears to be a promising alternative for the treatment of infections resistant to the available drug armamentarium [11]. This study showed that compounds containing copper and cadmium were able to inhibit *in vitro* growth of *P. insidiosum*, with MIC ranging from 4 to 64 µg/mL and 16 to 256 µg/mL and with MFC of 4 to 256 µg/mL and 16 to > 256 µg/mL, respectively.

The use of metallic compounds alone is hazardous due to toxicity, although many studies have been conducted with complexes of copper and antimicrobial substances to improve their activities against bacteria [13,14] and fungi [15,16]. Devereux et al. [17] observed a significant increase in therapeutic potential against *Candida albicans* when thiabendazole was complexed with copper. Copper complexes of thiosemicarbazones have been tested against the human pathogenic fungi *Aspergillus niger* and *Paecilomyces variotii* [18]. Similarly, Mendes et al. [19] complexed copper with thiosemicarbazone, revealing a significant reduction in the MIC against *C. albicans*.

Zabrieski et al. [20] tested nanoparticle formulations containing copper oxide and zinc oxide against *Pythium ultimum* and *Pythium aphanidermatum*. These authors showed that the copper-containing formulation demonstrated greater inhibition of the growth of oomycetes, whereas the formulation containing zinc showed only a fungistatic effect. The results observed for copper in the present study were similar to those reported by Zabrieski et al. [20]. The authors suggest that the siderophores secreted by *P. ultimum* and *P. aphanidermatum* to capture iron form complexes with copper. This process causes a disruption in the iron homeostasis of the microorganism. Zanette et al. [21] demonstrated the importance of iron in the pathophysiology of infections caused by *P. insidiosum*. The possible interference of iron metabolism by copper represents a probable copper toxicity mechanism. However, additional studies must be performed to assess this hypothesis.

Conclusion

The results of this study and of previous reports allow us to consider the possibility of developing different antimicrobial agents complexed to metallic compounds as a therapeutic alternative for the treatment of diseases caused by microorganisms that exhibit low susceptibility to available drugs. In addition, we suggest the use of copper and/or cadmium in the development of new formulations with antimicrobial activity against *P. insidiosum*. Further studies are required to evaluate the potential of these new complexed formulations against *P. insidiosum* in experimental models *in vitro* and *in vivo*.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Brazilian institutions: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for all scientific and financial support.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. De Cock AWAM, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of Pythiosis. J Clin Microbiol. 1987;25:344-349.
2. Leal ABM, Leal AT, Santurio JM, Kommers GD, Catto JB. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clinicopatológicos de casos típicos e atípicos. Pesquisa Vet Brasil. 2001;21:151-156.

3. Marcolongo-Pereira C, Sallis ESV, Raffi MB, Pereira DIB, Hinnah FL, Coelho ACB, Schild AL. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Vet Brasil*. 2012;32:865-868.
4. Weiblen C, Machado G, de Jesus FPZK, Santurio JM, Zanette RA, Pereira DIB, Diehl GN, Santos LC, Corbellini LG, Botton SA. 2016. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciênc. rural*. 2016;46:26-131.
5. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, Srimuang S. Do You Know Human Pythiosis? *J Infect Dis Antimicrob Agents*. 2008;25:45-51.
6. Santurio JM, Alves SH, Pereira DB, Argenta JS. Pitiose: uma micose emergente. *Acta Sci Vet*. 2006;34:1-14.
7. Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Pötter L, Spanamberg, A, Ferreiro L. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemoth*. 2007;60:1168-1171.
8. Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG, Scheurwater J, Vilela R, Mendoza L. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol*. 2010;146:1-16.
9. Pereira DIB, Botton SA, Azevedo MI, Motta MAA, Lobo RR, Soares MP, Fonseca AOS, Jesus FPK, Alves, SH, Santurio JM. Canine Gastrointestinal Pythiosis Treatment by Combined Antifungal and Immunotherapy and Review of Published Studies. *Mycopathologia*. 2013;176:309–315.
10. Fonseca AOS, Pereira DIB, Botton SA, Pötter L, Sallis ESV, Filho FSM, Zambrano CG, Maroneze BP, Valente JSS, Baptista CT, Braga CQ, Bem VD, Meireles MCA. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. *Vet Microbiol*. 2015;178:265-266.

11. Rocha DP, Pinto GF, Ruggiero R, Oliveira CA, Guerra W, Fontes APS, Tavares TT, Marzano IM, Pereira-Maia EC. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Quím Nova*. 2011;34:111-118.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard—2nd ed. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
13. Chohan ZH, Shaikh AU, Naseer MM. Metal-based isatin-bearing sulfonamides: their synthesis, characterization and biological properties. *Appl Organomet Chem*. 2006;20:729-739.
14. Martínez Medina JJ, Islas MS, Libertad LLT, Ferrer EG, Okulik NB, Williams PAM. Copper(II) complexes with cyanoguanidine and o-phenanthroline: Theoretical studies, in vitro antimicrobial activity and alkaline phosphatase inhibitory effect. *J Mol Struct*. 2014;1058:298-307.
15. Creaven BS, Devereux M, Karcz D, Kellett A, McCann M, Noble A, Walsh M. Copper(II) complexes of coumarin-derived Schiff bases and their anti-Candida activity. *J Inorg Biochem*. 2009;103:1196–1203.
16. Urquiza NM, Islas MS, Ariza ST, Jori N, Martínez Medina JJ, Lavecchia MJ, Tevez LLL, Lezama L, Rojo T, Williams PAM, Ferrer EG. Anti-thyroid and antifungal activities, BSA interaction and acid phosphatase inhibition of methimazole copper(II) complexes. *Chem-Biol Interact*. 2015;229:64-72.
17. Devereux M, McCann M, Shea DO, Kelly R, Egan D, Deegan C, Kavanagh K, McKee V, Finn G. Synthesis, antimicrobial activity and chemotherapeutic potential of inorganic derivatives of 2-(4-thiazolyl)benzimidazole{thiabendazole}: X-ray crystal structures of $[\text{Cu}(\text{TBZH})_2\text{Cl}]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{EtOH}$ and TBZH_2NO_3 (TBZH $\frac{1}{4}$ thiabendazole). *J Inorg Biochem*. 2004;98:1023-1031.

18. West DX, Ives JS, Krejci J, Salberg M, Zumbahlen TL, Bain G, Liberta A, Martinez JV, Ortiz SH, Toscano R. Copper(II) complexes of 2-benzoylpyridine 4N-substituted thiosemicarbazones. *Polyhedron*. 1995;14:2189-2200.
19. Mendes IC, Moreira JP, Speziali NL, Mangrich AS, Takahashia JA, Beraldo H. N(4)-tolyl-2-benzoylpyridine Thiosemicarbazones and their Copper(II) Complexes with Significant Antifungal Activity. Crystal Structure of N(4)-para-tolyl-2-benzoylpyridine Thiosemicarbazone. *J Brazil Chem Soc*. 2006;17:1571-1577.
20. Zabrieski Z, Morrell E, Hortin J, Dimkpa C, McLean J, Britt D, Anderson A. Pesticidal activity of metal oxide nanoparticles on plant pathogenic isolates of *Pythium*. *Ecotoxicology*. 2015;24:1305-1314.
21. Zanette RA, Bitencourt PER, Alves SH, Figuera RA, Flores MM, Wolkmer P, Hecktheuer PA, Thomas LR, Pereira PL, Loreto ES, Santurio JM. Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. *Vet Microbiol*. 2013;162:826-830.

Table 1 Minimum inhibitory and fungicidal concentrations for lead acetate, zinc acetate, zinc sulfate, manganese acetate, cadmium acetate and copper acetate against *Pythium insidiosum* isolates (n=23).

Metallic compounds	Time	N°. of isolates (%) with the following MIC ¹ or MFC ² (µg/mL):									MIC or MFC		MIC 50 ⁴	MIC 90 ⁵
		48 h	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	Range (µg/mL)		
Lead acetate	MIC									23 (100)	>256	>256	>256	>256
	MFC									23 (100)	>256	>256	-	-
Zinc acetate	MIC									23 (100)	>256	>256	>256	>256
	MFC									23 (100)	>256	>256	-	-
Zinc sulfate	MIC									23 (100)	>256	>256	>256	>256
	MFC									23 (100)	>256	>256	-	-
Manganese Acetate	MIC									23 (100)	>256	>256	>256	>256
	MFC									23 (100)	>256	>256	-	-
Cadmium acetate	MIC				2 (8.7)	3 (13.1)	5 (21.7)	7 (30.4)	6 (26.1)		16-256	91.88	128	256
	MFC				2 (8.7)	1 (4.3)	3 (13.1)	7 (30.4)	7 (30.4)	3 (13.1)	16->256	111.43	-	-
Copper acetate	MIC		3 (13.1)	7 (30.4)	5 (21.7)	4 (17.4)	4 (17.4)				4-64	15.52	8	64
	MFC		1 (4.3)	5 (21.7)	5 (21.7)	6 (26.1)	1 (4.3)	4 (17.4)	1 (4.3)		4-256	26.71	-	-

¹ MIC, minimum inhibitory concentration; ² MFC, minimum fungicidal concentration; ³ GM, geometric mean; ⁴ Minimal concentration to inhibit the growth of 50 % of isolates; ⁵ Minimal concentration to inhibit the growth of 90 % of isolates.

5. DISCUSSÃO

A busca de tratamentos mais eficazes para a pitose é um dos principais alvos de estudo das pesquisas com o oomiceto *P. insidiosum* (LORETO et al., 2014; FONSECA et al., 2015a,b; JESUS et al., 2015). A falta de um tratamento eficaz causa inúmeras perdas econômicas na criação de equinos (SANTOS et al., 2014) e constitui um importante problema à saúde animal (SANTURIO et al., 2006) e humana (KRAJAEJUN et al., 2006). Desta forma, estudos genéticos, bem como os testes de suscetibilidade deste oomiceto, auxiliam na compreensão das características singulares deste micro-organismo e podem fornecer informações úteis para o aprimoramento das terapias existentes, bem como para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

O capítulo 1 desta dissertação avaliou o perfil filogenético e filogeográfico dos isolados de *P. insidiosum* do Brasil e da Tailândia. Este estudo representa um passo importante para a compreensão dos padrões evolutivos e epidemiológicos deste oomiceto. Compreender os aspectos microevolutivos dos organismos é extremamente importante para elucidar as questões macroevolutivas (AVISE, 1987).

Estudos filogenéticos são usualmente realizados explorando a região (ITS) e a região mitocondrial do (*coxII*) (SCHURKO et al., 2003; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; AZEVEDO et al., 2012), entretanto existem outras regiões que podem apresentar características evolutivas diferentes e fornecer informações importantes neste sentido. Recentemente, o sequenciamento do genoma de *P. insidiosum* (ASCUNCE et al., 2015), ampliou o leque de possibilidades para os estudos envolvendo este oomiceto, uma vez que detectou mais de 17 mil genes codificadores de proteínas.

O gene *exo1* é apontado como um alvo em potencial para o desenvolvimento de testes de diagnóstico e imunoterapia (KRAJAEJUN et al., 2006b), como pode-se observar através dos muitos estudos desenvolvidos em anos anteriores (KEERATIJARUT et al., 2013, KEERATIJARUT et al., 2015a, KEERATIJARUT et al., 2015b). Além destas importantes aplicações, neste estudo este gene foi eficiente para os estudos filogenéticos e filogeográficos entre os isolados de *P. insidiosum*.

A parafilia entre os isolados tailandeses e brasileiros havia sido sugerida anteriormente por Azevedo et al. (2012). Entretanto, as análises realizadas nesta dissertação suportam significativamente esta relação e a árvore filogenética demonstra que os isolados neotropicais são derivados dos isolados asiáticos. Além disso, o estudo deste gene permitiu abordar outros aspectos do cenário evolutivo deste oomiceto.

A estrutura formada na análise SAMOVA foi congruente com os grupos formados na árvore filogenética, com exceção dos isolados da cidade tailandesa de Saraburi que possui isolados pertencentes aos dois grupos (clados) tailandeses. Adicionalmente, na análise AMOVA, a maior variação foi observada entre os grupos sugerindo que esta estruturação é antiga. Além disso, os baixos valores de diversidade e os sinais de expansão recente detectados nos isolados brasileiros suportam sua derivação dos grupos asiáticos, anteriormente indicados por Azevedo et al. (2012).

Contudo, a diferenciação incipiente observada através dos valores de F_{ST} entre os isolados brasileiros demonstra uma maior complexidade até então desconhecida da relação filogenética destes isolados. A estruturação observada entre as localidades brasileiras carece de uma maior investigação, uma vez que o número de isolados de cada localidade era pequeno e mesmo assim foi possível observar este fenômeno. Outros estudos devem ser realizados com um maior número de isolados, principalmente brasileiros, para avaliar as características estruturais observadas neste trabalho.

O capítulo 2 desta dissertação apresentou o estudo da suscetibilidade de *P. insidiosum* aos compostos metálicos de cádmio, chumbo, cobre, manganês e zinco. Nos últimos anos muitos estudos foram realizados explorando a toxicidade de metais na composição de fármacos com potencial terapêutico frente a bactérias (CHOHAN et al., 2006; MARTÍNEZ MEDINA et al., 2014) e fungos (DEVEREUX et al., 2004; CREAVENT et al., 2009; URQUIZA et al., 2015). Entretanto, não há relatos na literatura descrevendo o perfil de susceptibilidade de *P. insidiosum* a estes metais.

O crescimento de *P. insidiosum* quando na presença dos compostos de cobre e cádmio foi claramente afetado com concentrações inibitórias mínimas variando de 4-64 $\mu\text{g/mL}$ e 16-256 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Destaca-se o maior efeito inibitório do acetato de cobre, pois em baixas concentrações foi capaz de inibir a grande maioria dos isolados testados. Portanto, podemos considerar esses metais candidatos para o desenvolvimento de quimioterápicos com grande potencial terapêutico contra a pitiose.

A interferência do cobre no metabolismo do ferro em isolados de *Pythium ultimum* e *Pythium aphanidermatum in vitro* foi descrita por Zabrieski et al. (2015). Um mecanismo similar pode estar ocorrendo com *P. insidiosum*, uma vez que este micro-organismo apresenta uma alta afinidade por ferro (ZANETTE et al., 2013) e sua homeostase pode estar sendo afetada pela presença do cobre. No entanto, esta hipótese não foi testada neste trabalho, portanto, estudos adicionais são necessários para sua comprovação.

Nosso estudo aponta a possibilidade do uso do cobre em formulações eficazes *in vivo* contra *P. insidiosum*. De modo a fortalecer esta hipótese, existem evidências de que o cobre possa ser um elemento muito útil no combate de infecções por micro-organismos. A deficiência de cobre em mamíferos compromete a função imune celular e torna os hospedeiros mais suscetíveis às infecções microbianas. Aparentemente as células envolvidas na imunidade inata utilizam as propriedades tóxicas do cobre para atacar os organismos invasores (FESTA & TIELE, 2012).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta dissertação conclui-se que:

- O emprego do gene *exol* demonstrou que este é um importante marcador para o estudo da filogenia e filogeografia de *P. insidiosum*.
- A análise filogenética e filogeográfica dos isolados brasileiros e tailandeses a partir das sequências parciais do gene *exol* foi capaz de esclarecer os padrões evolutivos deste oomiceto. Os isolados brasileiros de *P. insidiosum* são derivados dos isolados tailandeses. Os isolados da Tailândia possuem uma diversidade muito maior que os isolados do Brasil, comprovando a origem mais antiga dos isolados de *P. insidiosum* tailandeses em relação aos brasileiros. Portanto, os isolados brasileiros apresentam sinais de estruturação, evidenciando a necessidade de mais estudos nestas populações, uma vez que fenômenos evolutivos estão ocorrendo.
- Este estudo certamente representa um primeiro passo importante para compreender a epidemiologia e evolução de *P. insidiosum*.
- Isolados de *P. insidiosum* tiveram seu crescimento inibido na presença de compostos contendo cádmio e cobre. Portanto, pode-se considerar esses metais como candidatos para o desenvolvimento de quimioterápicos com grande potencial terapêutico contra a pitiose. Entretanto, são necessários estudos para avaliar a toxicidade e eficácia *in vivo* destes metais.

7. 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

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, fev. 2008.

ASCUNCE, M. S. et al. Whole genome sequence of the emerging oomycete pathogen *Pythium insidiosum* strain CDCB5653 isolated from an infected human in the USA. **Genomics Data**, v. 7, p. 60–61, 23 nov. 2015.

AVISE, J. C. et al. INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 18, p. 489-522. 1987.

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

AZEVEDO, M. I. et al. Phylogenetic relationships of brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 1-2, p. 141–148, 14 set. 2012.

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

BERRYESSA, N. A. et al. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 1065-1069. jul./ago. 2008.

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

BLOOMQUIST, E. W.; LEMEY P.; SUCHARD, M. A. Three roads diverged? Routes to phylogeographic inference. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 11, p. 626-632, nov. 2010.

BOSCO, S.M. et al. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 715-8, maio 2005.

BOTTON, S.A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology**. v. 62, n. 4, p. 1225-1229, abr. 2011.

- 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, nov. 1988.
- CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3710-3713, out. 2011.
- CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. 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, nov. 2004.
- 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, 12 jun. 2009.
- CHAIPRASERT, A. et al. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycoses**, v. 33, n. 6, p. 317-323, jun. 1990.
- CHEN, W.; DU, K.; HE, S. Genetic structure and historical demography of *Schizothorax nukiangensis* (Cyprinidae) in continuous habitat. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 4, p. 984-995, fev. 2015.
- CHOHAN, Z. H.; SHAIKH, A. U.; NASEER, M. M. Metal-based isatin-bearing sulfonamides: their synthesis, characterization and biological properties. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 729-739, jun. 2006.
- CONNOLLY, S. L. et al. Dual infection with *Pythium insidiosum* and *Blastomyces dermatitidis* in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 3, p. 419-423, set. 2012.
- CREAVEN, B. S. et al. Copper(II) complexes of coumarin-derived Schiff bases and their anti-Candida activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 9, p. 1196-1203, set. 2009.
- DEVEREUX, M. et al. Synthesis, antimicrobial activity and chemotherapeutic potential of inorganic derivatives of 2-(40-thiazolyl)benzimidazole{thiabendazole}: X-ray crystal structures of [Cu(TBZH)₂Cl]Cl.H₂O.EtOH and TBZH₂NO₃ (TBZH^{1/4}thiabendazole). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1023-1031, jun. 2004.
- DUPANLOUP, I.; SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2571-2581, dez. 2002.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368-376. 1981.
- FERNANDES, C. P. M. et al. Gastric pythiosis in a dog. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 4, p. 235-237, out./dez. 2012.
- FESTA, R. A.; THIELE, D. J. Copper at the front line of the host-pathogen battle. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 9, set. 2012.

FISHER, R. A. **The genetical theory of natural selection.** New York: Oxford University Press, 1930. 318 p.

FONSECA, A. O. S. et al. *In vitro* susceptibility of brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some *Lamiaceae* family species. **Mycopathologia**, v. 179, n. 3-4, p. 252-258, abr. 2015a.

FONSECA, A. O. S. et al. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Veterinary Microbiology**, v. 178, n. 3-4, p. 265-266, 5 ago. 2015b.

FRANKHAM R., BALLOU J. D., BRISCOE D. A. **Introduction to conservation genetics.** Cambridge University Press, New York. 2010. 644p.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915-925, out. 1997.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**. v. 146, n. 1-2, p. 1-16, 20 nov. 2010.

GARRICK, R. C.; CACCONE, A.; SUNNUCKS, P. Inference of population history by coupling exploratory and model-driven phylogeographic analyses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1190-1227, 24 mar. 2010.

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

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

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, mar./abr. 2002.

GUTIÉRREZ, L. A. et al. Microgeographic genetic variation of the malaria vector *Anopheles darlingi* root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 38-47, jul. 2010.

HENNIG, W. Phylogenetic systematics. **Annual Review of Entomology**, v. 10, p. 97-116, jan. 1965.

HOLDER, M.; LEWIS, P.O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 4, p. 275-284, jan. 2003.

JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5621-5625, set. 2014.

JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical Mycology**, v. 25, n. 2, p. e89-e93, jun. 2015.

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, abr. 2011.

KEERATIJARUT A, et al. A peptide ELISA to detect antibodies against *Pythium insidiosum* based on predicted antigenic determinants of exo-1, 3- β -glucanase. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 44, n. 4, p. 672-680, 4 jul. 2013.

KEERATIJARUT A, et al. The immunoreactive exo-1,3- β -glucanase from the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* is temperature regulated and exhibits glycoside hydrolase activity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 11 ago. 2015a.

KEERATIJARUT A, et al. Detection of the oomycete *Pythium insidiosum* by real-time PCR targeting the gene coding for exo-1,3- β -glucanase. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 971-977, set. 2015b.

KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 569-576, 1 set. 2006a.

KRAJAEJUN, T. et al. Identification of a novel 74-kilodalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1674-1680, maio 2006b.

KRAJAEJUN, T. et al. Do you know human pythiosis? **Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 1, p. 45-51, jan./abr. 2008.

KRAJAEJUN, T. et al. The 74-kilodalton immunodominant antigen of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* is a putative exo-1,3- β -glucanase. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 8, p. 1203-1210, ago. 2010.

KRAJAEJUN, T. et al. Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Fungal Biology**, n. 115, v. 7, p. 683-696, jul. 2011.

KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, p. S1-7, ago. 1994.

LEAL, A. B. M. et al. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínicopatológicos de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 151-156, out./dez, 2001a.

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

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, jul. 2011.

LORETO, E. S. et al. New insights into the in vitro susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7534-7537, dez. 2014.

MARTÍNEZ MEDINA, J. J. et al. Copper(II) complexes with cyanoguanidine and o-phenanthroline: Theoretical studies, in vitro antimicrobial activity and alkaline phosphatase inhibitory effect. **Journal of Molecular Structure**, v.1058, p. 298-307, 24 jan. 2014.

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

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**. v.6, p. 151–164, 1996.

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

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

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York, 1987, 512p.

NEI, M., KUMAR, S., TAKAHASHI K. The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12390-12397, 13 out. 1998.

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

OHNISHI, H., IMAI, H. T., YAMAMOTO, M. T. Molecular phylogenetic analysis of ant subfamily relationship inferred from rDNA sequences. **Genes & Genetic Systems**, v. 78, n. 6, p. 419-425, dez. 2003.

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, p. 1168-1171, nov. 2007.

PEREIRA D. I. B. et al. Canine Gastrointestinal Pythiosis Treatment by Combined Antifungal and Immunotherapy and Review of Published Studies. **Mycopathologia**, v.176, n. 3-4, p. 309–315, out. 2013.

PÉREZ, R. C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**. v.109, n. 1-2, p. 121–128, 10 ago. 2005.

PERMPALUNG, N. et al. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 6, p. 1885-92, 2015.

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

PESSOA, C. R. M. et al. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 24, n. 6, p. 1133-1136, nov. 2013.

PRACHARKTAM, R. et al. Immunodiffusion test for diagnosis and monitoring of human pythiosis insidiosus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2661-2662, nov. 1991.

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

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

RUIZ-SANCHEZ, E.; ORNELAS J. F. Phylogeography of *Liquidambar styraciflua* (*Altingiaceae*) in Mesoamerica: survivors of a Neogene widespread temperate forest (or cloud forest) in North America? **Ecology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 311-328, fev. 2014.

SANTOS, C.E.P. et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian pantanal and nearby areas: results of 76 cases. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 34, n. 2, p. 270-274, fev. 2014.

SANTURIO, J.M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosus developed and evaluated. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2535–2540, 2 jun. 2003.

SANTURIO, J. M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, 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, jan./mar. 2006b.

SCHENEIDER, H. **Métodos de análise Filogenética – um guia prático**. 3ed. Ribeirão Preto: Holos Editora. 2007. 200p.

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, jun. 2004.

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

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, nov. 1989.

THANATHANEE, O et al. Outbreak of *Pythium* Keratitis During Rainy Season: A Case Series. **Cornea**, v. 32, n. 2, p. 199-204, fev. 2013.

THONGSRI, Y et al. Evaluation for the Clinical Diagnosis of *Pythium insidiosum* Using a Single-Tube Nested PCR. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5-6, p. 369–376, dez. 2013.

URQUIZA N. M. et al. Anti-thyroid and antifungal activities, BSA interaction and acid phosphatase inhibition of methimazole copper(II) complexes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 229, p. 64-72, 5 mar. 2015.

VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 219-224, fev. 2011.

ZABRIESKI, Z. et al. Pesticidal activity of metal oxide nanoparticles on plant pathogenic isolates of *Pythium*. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 6, p. 1305-1314, ago. 2015.

ZANETTE, R. A. et al. Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 826-830, 23 mar. 2013.

ŽIVEC, P. et al. Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin: Structure, DNA- and albumin-binding. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 117, p. 35-47, dez. 2012.

WANACHIWANAWIN, W. 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, 9 set. 2004.

WEIBLEN, C. **Soroprevalência da pitiose equina no Rio Grande do sul, diagnóstico e controle da Pitiose em modelo experimental**. 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian Populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97-159, mar. 1931.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, n. 4, p. 323-354, mar. 1951.

WORSTER, A. A. et al. Pythiosis with bone lesions in a pregnant mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.211, n. 11, p. 1795-1798, 1 jun. 2000.

YAN, J., LI, H., ZHOU K. Evolution of the mitochondrial genome in snakes: Gene rearrangements and phylogenetic relationships. **BMC Genomics**, v. 9, n. 569, 20 nov. 2008.