

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

BRUNO MALTEZ MIRAGLIA

**INVESTIGAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E  
FILOGENÉTICAS DOS ISOLAMENTOS DE *Pythium insidiosum* EM CASOS  
DE CERATITE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BELO HORIZONTE

2021

BRUNO MALTEZ MIRAGLIA

**INVESTIGAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E  
FILOGENÉTICAS DOS ISOLAMENTOS DE *Pythium insidiosum* EM CASOS  
DE CERATITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Ciências da Saúde. Infectologia e Medicina Tropical. Oftalmologia Tropical

ORIENTADORA: Prof. Dra. Raquel Virginia Rocha Vilela

BELO HORIZONTE

2021

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Reitor: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

## **FACULDADE DE MEDICINA**

Diretor: Prof. Humberto José Alves

Vice-Diretora: Professora Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizio Afonso Nunes

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Profa. Eli Iola Gurgel Andrade

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Coordenador: Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Sub-Coordenador: Prof. Antonio Luiz Pinho Ribeiro

Colegiado:

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

Prof. Antonio Luiz Pinho Ribeiro

Profa. Mariana Costa Duarte

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof. Unai Tupinambás

João Augusto Oliveira da Silva - Representante discente

M671i Miraglia, Bruno Maltez.  
Investigação das características moleculares e filogenéticas dos  
isolamentos de *Pythium insidiosum* em casos de Ceratite [recursos eletrônicos].  
/ Bruno Maltez Miraglia. -- Belo Horizonte: 2021.  
64f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Raquel Virginia Rocha Vilela.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade  
de Medicina.

1. Pythium. 2. Ceratite. 3. Úlcera da Córnea. 4. Filogenia. 5. Bases de  
Dados Genéticas. 6. Reação em Cadeia da Polimerase. 7. Dissertação  
Acadêmica. I. Vilela, Raquel Virginia Rocha. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WW 225

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**"Investigação das características moleculares e filogenéticas dos isolamentos de *Phytium insidiosum* em casos de ceratite"**

**BRUNO MALTEZ MIRAGLIA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 31 de maio de 2021, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

**PROFA. RAQUEL VIRGÍNIA ROCHA VILELA** - Orientadora

UFMG

**PROF. ALBERTO LEONEL MENDOZA**

MICHIGAN STATE UNIVERSITY

**PROFA. ADRIANA OLIVEIRA COSTA**

UFMG

Belo Horizonte, 31 de maio de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Virginia Rocha Vilela, Professora do Magistério Superior**, em 31/05/2021, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Oliveira Costa, Professora do Magistério Superior**, em 31/05/2021, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alberto Leonel Mendoza, Usuário Externo**, em 01/06/2021, às 13:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0739975** e o código CRC **89214B6D**.

Para Dorothy

O amor tem 4 letras e por certo 4 patas.  
Não diferencia ouro ou um pedaço de lata.  
Não fala, não sabe ler mas diz tudo  
para você com o poder de um olhar.  
Tão puro e tão leal, tem o dom especial  
de sempre nos perdoar.

**(Bráulio Bessa)**

## AGRADECIMENTOS

À Luiza, pela ajuda incondicional que possibilitou a construção e escrita desta dissertação. Agradeço por compreender as minhas limitações e estar ao meu lado para afastar minhas angústias quando era mais difícil prosseguir. Este trabalho não teria sido possível sem sua presença.

À Professora Raquel, pela acolhida carinhosa como seu aluno em um projeto de pesquisa e seu talento único que me envolveu nesse universo acadêmico especialmente desafiador. Obrigado por não ter medido esforços que me motivaram a prosseguir com seu exemplo de energia e otimismo.

Ao Professor Leonel Mendoza, cuja presença e companhia me deixam muito honrado. Sua grandeza como professor e pesquisador convivem com uma humildade inspiradora.

À Gabriella, que dedicou seu tempo e esforços na ajuda para as realizações e práticas que viabilizaram esse trabalho.

Ao Dr. Orestes, pelo exemplo diário de ética, excelência profissional e busca constante de crescimento.

À minha mãe, Maria do Carmo, pelo incentivo entusiasmado e pela minuciosa revisão deste trabalho. Certamente o amor que dedicou à essa tarefa contribuiu junto com sua experiência acadêmica e científica em sugestões tão cuidadosas e enriquecedoras.

À Universidade Federal de Minas Gerais, que há 17 anos é minha casa e à Michigan State University, onde tive a oportunidade de estar em uma experiência de inestimável crescimento.



## RESUMO

**Introdução:** *Pythium insidiosum* é um microrganismo fenotipicamente semelhante aos fungos com hifas, mas este oomyceto pertencente ao filo Straminofila, filogeneticamente separado dos fungos verdadeiros. Usando metodologias moleculares, isolados de *P. insidiosum* foram colocados em três grupos filogenéticos de acordo com sua distribuição geográfica. Mais recentemente, quatro grupos filogenéticos foram relatados. *Pythium insidiosum* é capaz de causar infecções graves em humanos. Pode acometer os olhos na forma de ceratites e infecções dos tecidos adjacentes que ameaçam não apenas a visão, mas também a vida do paciente. Devido ao desenvolvimento de hifas, frequentemente a infecção por esse patógeno é confundida e diagnosticada erroneamente como infecção fúngica.

**Objetivo:** Investigar as características moleculares e filogenéticas dos isolamentos de *P. insidiosum* recuperados de quatorze amostras coletadas na Índia em casos de ceratite.

**Materiais e Métodos:** Foram avaliados quatorze isolamentos de *P. insidiosum* dos quais foram extraídos o DNA e, então, realizados PCR com *primers* universais. Prosseguiu-se com amplificação das sequências utilizando Internal Transcriber Spacers (ITS) e Citocromo C Oxidase subunidade II (COXII). As análises filogenéticas subsequentes, utilizando as sequências de ITS e COXII, foram analisadas pelo método estatístico *Neighbor Joining* (MEGAX).

**Resultados:** As árvores filogenéticas usando as sequências de DNA amplificadas (ITS e COXII) mostraram resultados análogos. As sequências provenientes dos quatorze isolamentos analisados foram especificamente colocadas, com alto suporte de bootstrap, no grupo II (Ásia, Austrália e África) e no grupo IV (Tailândia, Israel), de acordo com a divisão atual de *P. insidiosum*. Do total dos quatorze isolamentos, dez foram colocados no grupo II e quatro no grupo IV. Interessantemente, nenhum dos isolamentos foi colocado nos grupos I e III (Américas). Foi possível comprovar que os dez isolados neste estudo foram identificados como *P. insidiosum* comprovando a hipótese inicial. No entanto, como foi postulado anteriormente, ao avaliar as quatro sequências localizadas no grupo IV a existência de uma espécie inteiramente nova é fortemente

suportada. Para confirmar essa hipótese, são necessários novos estudos baseados em análises estatísticas.

**Conclusão:** Pacientes com ceratite resistente ao tratamento convencional, de rápida evolução, com cultura de padrão de crescimento com presença de micélios submersos aderidos ao ágar devem alertar sobre a possibilidade de infecção por *P. insidiosum*. Para a confirmação de possíveis isolados de *P. insidiosum*, técnicas moleculares devem ser realizadas. Esses foram os passos seguidos no presente estudo tornando possível a identificação do agente etiológico das ceratites da Índia como *P. insidiosum*. Além disso, as técnicas filogenéticas usadas neste e em outros estudos, sugeriram a possibilidade de uma nova espécie dentro do complexo *P. insidiosum*, o que provavelmente é uma das contribuições mais importantes deste estudo.

**Palavras-chave:** *Phytium*, Ceratite, Úlcera da Córnea, Filogenética, Bases de Dados Genéticas, Reação em Cadeia da Polimerase

## ABSTRACT

**Introduction:** *Pythium insidiosum* is a microorganism phenotypically like fungi with hyphae, but this oomycete belongs to the phylum Straminopila phylogenetically away from true fungi. Using molecular methodologies, isolates of *P. insidiosum* were placed in three phylogenetic groups according to their geographic distribution. More recently, four phylogenetic groups were reported. *Pythium insidiosum* can cause serious infections in humans. It can affect the eyes in the form of keratitis and infections of adjacent tissues that threaten not only the eyesight, but also the patient's life. Due to the development of hyphae, infection with this pathogen is often mistaken and misdiagnosed as a fungal infection.

**Objective:** To investigate the molecular and phylogenetic characteristics of the isolates of *P. insidiosum* recovered from fourteen samples collected in Indian cases of keratitis.

**Materials and Methods:** Fourteen *P. insidiosum* isolates were evaluated, from which DNA was extracted and then PCR with universal primers was performed. PCR amplification was performed using Internal Transcriber Spacers (ITS) and Cytochrome C Oxidase S subunit II (COXII) primers and subsequently sequenced. Phylogenetic analyzes, using the aligned ITS and COXII sequences, were analyzed by the Neighbor Joining method (MEGAX).

**Results:** Phylogenetic trees using the amplified DNA sequences (ITS and COXII) showed similar results. The DNA sequences from the fourteen analyzed isolates were specifically placed, with high bootstrap support, in group II (Asia, Australia and Africa) and in group IV (Thailand, Israel), according to the current phylogenetic cluster classification of *P. insidiosum*. Of the fourteen isolates, ten were placed in cluster II, and four of them in cluster IV. Interestingly, none of the isolations were placed in clusters I and III (The Americas). The ten isolates in this study were identified as *P. insidiosum*, which support the initial hypothesis. As was previously postulated, this study found that the four Indian DNA sequences located in cluster IV represent an entirely new specie. To confirm this finding, further studies based on statistical analysis are needed.

**Conclusion:** Patients with keratitis of rapid clinical progression, resistant to conventional treatment, with the presence of submerged mycelia adhered to the agar should alert clinicians about the possibility of infection caused by *P. insidiosum*. To identify possible *P. insidiosum* isolates, molecular techniques must be performed. Molecular and phylogenetic analyses were used in the present study making it possible to identify the etiological agent of keratitis in India as *P. insidiosum*. In addition, phylogenetic analyses in this and other studies, suggested the possibility of a new species within *P. insidiosum* complex, which is probably one of the most important contributions of this study.

**Keywords:** Phytium, Keratitis, Corneal Ulcer, Filogenetics, Genetic Database, Polimerase Chain Reaction

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Localização filogenética de <i>Phytium spp.</i> ....	18
Figura 1.2. Ciclo de vida de <i>Pythium insidiosum</i> na natureza. ....	20
Figura 1.3. Distribuição geográfica da Pitiose nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. ....	22
Figura 1.4. Úlcera corneana infecciosa.....	24
Figura 1.5. Úlcera corneana por <i>P. insidiosum</i> .....	25
Figura 1.6. Microscopia confocal.....	27
Figura 1.7. Morfologia dos filamentos em córnea infectada no exame de microscopia confocal <i>in vivo</i> . ....	27
Figura 1.8. Raspado de córnea infectada por <i>P. insidiosum</i> com KOH a 10% .....	28
Figura 1.9. Morfologias de <i>P. insidiosum</i> cultivados .....	29
Figura 1.10. Microscopia eletrônica de transmissão dos zoósporos móveis de <i>Pythium insidiosum</i> . ....	30
Figura 1.11. Tecido corado com metamina de córnea acometida por <i>P. insidiosum</i> .....	31
Figura 1.12. Correlação clinicopatológica de uma infecção corneana por <i>P. insidiosum</i> .....	31
Figura 1.13. (A) Infiltrados com afinamento do estroma nas bordas, (B) após aplicação e cola de cianoacrilato. ....	33
Figura 1.14. Ceratoplastia penetrante com bom resultado após seis meses pós-operatório. ....	33
Figura 4.1. Local de coleta das amostras doadas para realização do presente estudo e sua localização geográfica.....	36

Figura 4.2. Desenho esquemático do procedimento de cultivo e avaliação com lactofenol azul.....	37
Figura 4.3. Desenho esquemático do mecanismo de zoosporogênese utilizado.....	38
Figura 5.1. Padrão de crescimento após plantio em ágar Sabouraud .....	41
Figura 5.2. PCR das amostras de DNA obtidas dos isolamentos deste estudo.....	43
Figura 5.3. Árvore filogenética sequência ITS, método <i>Neighbor joining</i> , visão geral.....	45
Figura 5.4. Árvore filogenética sequência ITS, método <i>Neighbor joining</i> , detalhamento cluster I (Américas).....	46
Figura 5.5. Árvore filogenética sequência ITS, método <i>Neighbor joining</i> , detalhamento cluster II (Ásia, Austrália e África).....	47
Figura 5.6. Árvore filogenética sequência ITS, método <i>Neighbor joining</i> , detalhamento cluster I (Américas).....	47
Figura 5.7. Árvore filogenética sequência ITS, método <i>Neighbor joining</i> , detalhamento cluster IV (Israel, Tailândia).....	48
Figura 5.8. Árvore filogenética sequência COXII, método <i>Neighbor joining</i> , visão geral. ....	49

## TABELA

Tabela 5.1. Padrão epidemiológico dos pacientes de acordo com os parâmetros idade, sexo, história de contato com água e ocupação..... 42

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose 2%

BLD – Laboratório de Diagnóstico Biomédico da Universidade Michigan State

COX – Citocromo C Oxidase

COXII – Citocromo C Oxidase Subunidade II

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ITS – Espaçador Interno Transcrito

MSU – Michigan State University

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NJ – *Neighbor joinig* (método computacional)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RPM – Rotações por minuto

SAR – Super Grupo Straminopiles, Alveolates e Rhizaria

SPR – *Algoritmo subtree-pruning-regrafting*

SDB – Caldo de Dextrose Sabouraud 2%



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1. Classificação Taxonômica e Características de <i>Pythium insidiosum</i> .....	17
1.2. Epidemiologia e Distribuição Geográfica da Pitiose .....	19
1.3. Ceratites por <i>Pythium insidiosum</i> .....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS .....	35
3.1. Objetivo Geral .....	35
3.2. Objetivos Específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
4.1. Coleta do material de casos de ceratite por <i>P. insidiosum</i> na Índia.....	36
4.2. Cultivo das amostras clínicas .....	36
4.3. Zoosporogênese.....	37
4.4. Extração de DNA e PCR dos cultivos do <i>P. insidiosum</i> .....	39
4.5. Amplificação dos Internal Transcriber Spacers (ITS) e da subunidade II (COXII) do citocromo c oxidase .....	39
4.6. Análises filogenéticas utilizando as sequências de ITS e COXII.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Cultura .....	41
5.2. Aspectos Microscópicos .....	41
5.3. Sumarização de Dados Clínicos .....	42
5.4. PCR dos isolamentos .....	43
5.5. Análise Filogenética .....	44
6. DISCUSSÃO .....	50
7. CONCLUSÃO .....	55
8. REFERÊNCIAS .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Classificação Taxonômica e Características de *Pythium insidiosum*

*Pythium insidiosum* é um microrganismo classificado no filo Straminofila, classe Oomycota, ordem Pythiales, família Pythiaceae. Foi descrito há mais de 150 anos em equinos na Indonésia, mas seu isolamento em cultura só foi possível em 1901 por cientistas holandeses trabalhando com cavalos na Indonésia (MENDOZA, 2005; GAASTRA *et al.*, 2010). Recentemente esses patógenos foram reclassificados dentro do *super-grupo* SAR (Straminopiles, Alveolates e Rhizaria) (ADL *et al.*, 2012; GAASTRA *et al.*, 2010). O gênero *Pythium* possui mais de 120 espécies, sendo a maioria habitantes do solo e patógenos de plantas (GAASTRA *et al.*, 2010; MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2014).

Estudos moleculares mostraram que as cepas de *Pythium insidiosum* se agrupam filogeneticamente de acordo com sua origem geográfica. Foi demonstrado que *P. insidiosum* se divide em três grupos filogenéticos: o grupo I, contendo apenas isolados do hemisfério oeste, e os grupos II e III, contendo isolados do resto do mundo. Na Tailândia, onde a pitiose humana é endêmica, são encontradas variantes dos grupos II e III (SCHURKO *et al.*, 2003; SUPABANDHU e FISCHER e VANITTANAKOM, 2007; CHAI PRASERT *et al.*, 2009). Apesar da hipótese de que a diversidade genética de *P. insidiosum* pudesse estar implicada nas diferenças clínicas entre espécies, não se estabeleceu associação de especificidade, entre os grupos filogenéticos do oomiceto e as regiões geográficas ou os hospedeiros (CHAI PRASERT *et al.*, 2009). Assim, é possível que *P. insidiosum* seja um complexo filogenético de espécies intimamente relacionadas ou talvez um complexo de diferentes linhagens pertencentes a uma única espécie (JORGENSEN e PFALLER, 2015).

Nos últimos anos, tem sido geradas fortes evidências filogenéticas indicando que os straminofilos não são fungos, mas sim microrganismos protistas estreitamente relacionados às algas e plantas (GAASTRA *et al.*, 2010,

VILELA *et al.*, 2018, BAULDAUF *et al.*, 2000). A localização filogenética de *Pythium* sp está esquematizada na Figura 1.1.

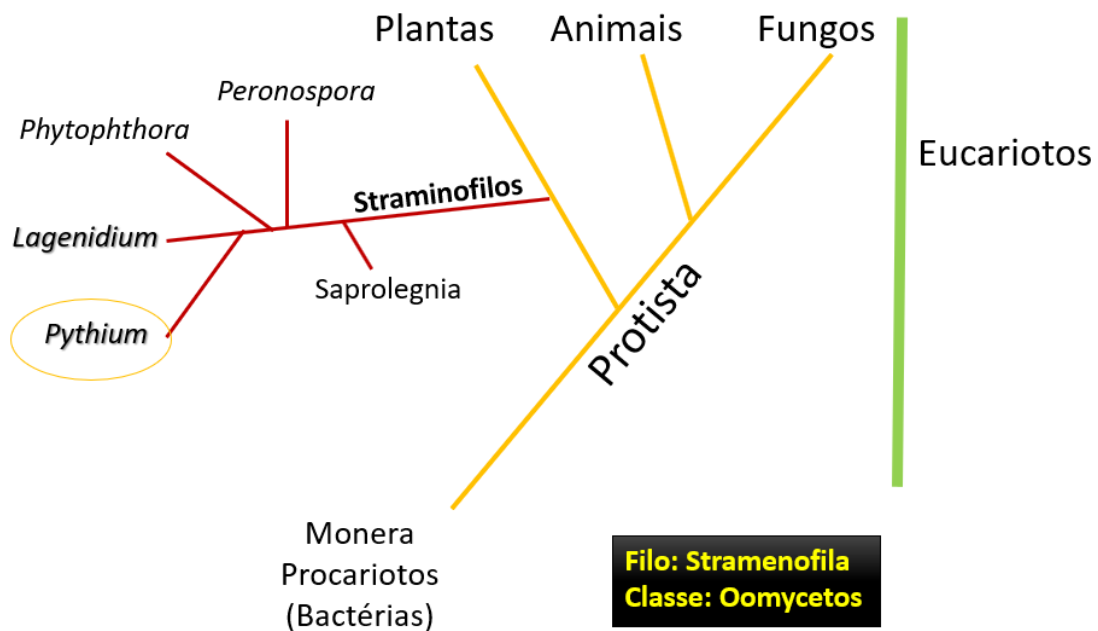


Figura 1.1. Localização filogenética de *Pythium* spp. com outros *Microorganismos Eucariontes*

Microscopicamente, *P. insidiosum* desenvolve micélios como os fungos, mas não é um fungo verdadeiro, uma vez que sua parede celular não contém quitina, mas compostos de celulose e glicanos. Além disso, sua membrana citoplasmática não possui ergosterol composto presente nas células fúngicas (AGARWAL *et al.*, 2018; GAASTRA *et al.*, 2010).

O microrganismo se apresenta de duas formas distintas. Na forma de hifas caracterizadas por ramificação em ângulo reto; e na forma de vesículas contendo zoósporos biflagelados móveis em ambientes aquáticos (AGARWAL *et al.*, 2018). Essa última é estimulada pela presença de íons e possuem quimiotaxia por matéria vegetal e tecidos animais (GAASTRA *et al.*, 2010).

## 1.2. Epidemiologia e Distribuição Geográfica da Pitiose

*Pythium spp.* são microrganismos ecologicamente versáteis que ocorrem em praticamente todos os tipos de solo e ambientes úmidos (MENDOZA, 2005). Várias espécies de *Pythium* são patógenos de plantas, mas, de todas as descritas (cerca de 120), apenas *P. insidiosum* (e o recentemente reconhecido *P. aphanidermatum*) são os únicos membros do gênero causadores de doenças em mamíferos, incluindo os humanos (MENDOZA, 2005; LANTERNIER *et al.*, 2015).

Desde o século passado, a presença de água e ambientes úmidos têm sido relacionados à casos de doenças granulomatosas em equinos. Há relatos de que cavalos frequentemente desenvolviam pitioses após pastarem por longos períodos em águas paradas. A pitiose já foi descrita como câncer do pântano em algumas áreas do mundo, e sua relação com ambientes úmidos tem sido suspeitada desde as descrições iniciais da doença (MENDOZA, 2005). A infecção pelo oomiceto *P. insidiosum* está fortemente associada ao contato dos animais com águas contaminadas, onde ocorre a liberação de zoósporos biflagelados (CHAFFIN *et al.*, 1995), não havendo, por isso, predisposição de raça, sexo e idade (SANTOS *et al.*, 1987). Os zoósporos livres na água são atraídos por pelos ou tecido epitelial danificado. Uma vez fixados na ferida, se encistam e produzem o tubo germinativo que inicia a lesão (MENDOZA *et al.*, 1993). A Figura 1.2 mostra o ciclo de vida do *P. insidiosum* na natureza.

O acesso dos animais a fontes de água e ambientes externos é descrito em quase todas as espécies, sendo que boa parte dos animais permanece algum tempo submerso nela (IMWIDTHAYA, 1994; MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2014; MENDOZA *et al.*, 1996; TABOSA *et al.*, 2004; CAMUS *et al.*, 2004; BUERGELT e POWE e WHITE, 2006; BERRYESSA *et al.*, 2008; GRECCO *et al.*, 2009).

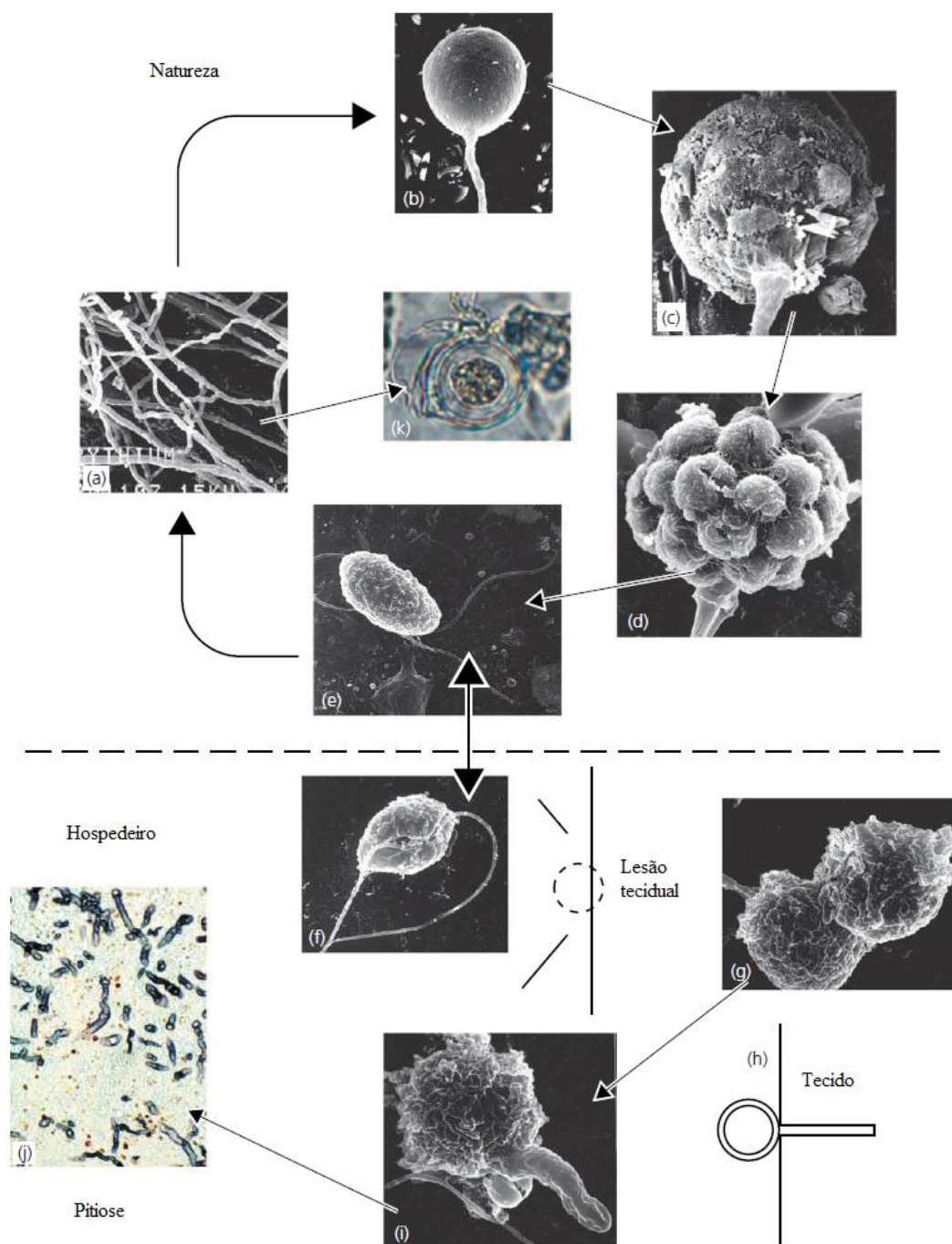


Figura 1.2. Ciclo de vida de *Pythium insidiosum* na natureza. Primeiramente o tecido da planta é colonizado por uma (a) hifa de e, posteriormente (b–d) a diferenciação do esporângio em estágios mais maduros levam à (e) liberação de zoósporos. (f) Os zoósporos nadam para encontrar outra planta ou podem ser atraídos por tecido animal lesado. Os zoósporos encistados (g) ligados ao tecido por substância adesiva, germinam (h), invadem o hospedeiro (i), e causam pitiose. (j). A produção de oosporos ocorrem na natureza e podem servir como (k) esporos de resistência. Fonte: Adaptado de MENDOZA, 2005.

Recentemente, entretanto, casos de pitiose foram observados nos estados norte-americanos da Califórnia e Arizona, onde o clima não se encaixa nessa descrição. Essas observações podem indicar que o nicho ambiental do *Pythium insidiosum* está se expandindo, provavelmente em consequência de mudanças ambientais como inundações deliberadas ou desenvolvimento de ambientes irrigados (GAASTRA *et al.*, 2010).

A Pitiose é uma doença das áreas temperadas, subtropicais e tropicais. A infecção já foi reportada em regiões do Sudeste asiático (Índia, Indonésia, Japão, Nova Guiné, Tailândia), na Costa Leste da Austrália e Nova Zelândia, América do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia, Venezuela), América Central e Ilhas do Caribe (Costa Rica, Guatemala, Haiti, Panamá e Nicarágua) e na América do Norte (México e Estados Unidos) (MERZ e HAY, 2007; MENDOZA e NEWTON, 2005; GAASTRA *et al.*, 2010). Existem alguns relatos em regiões da Europa próximas ao mediterrâneo, mais especificamente na Grécia (CHAFFIN *et al.*, 1995; PATEL *et al.*, 2012; MENDOZA e NEWTON, 2005; MENDOZA *et al.*, 1996).

A localização geográfica e o clima tropical da África parecem ser ideais para a pitiose, entretanto, o primeiro caso foi descrito no continente apenas em 2005 (MENDOZA, 2005; GAASTRA *et al.*, 2010).

No Brasil, a região do Pantanal, maior área alagada de água doce do mundo, talvez tenha as maiores taxas de incidência e prevalência de pitiose equina do planeta, mas não há estudos sistemáticos que corroborem essa impressão (MENDOZA, 2005; GAASTRA *et al.*, 2010). A Figura 1.3 mostra a distribuição geográfica da Pitiose atualmente conhecida no mundo.

Relatos de úlceras de córnea infecciosa causados por *P. insidiosum* têm recebido atenção especial nos últimos 5 anos, devido a numerosos casos reportados na Índia e na Tailândia, além da ocorrência de casos esporádicos no resto do mundo, em regiões tropicais e subtropicais (IMWIDTHAYA, 1994, RIBEIRO *et al.*, 2017; THANATHANEE *et al.*, 2013, HASIKA *et al.*, 2019).



Figura 1.3. Distribuição geográfica da Pitiose nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Adaptado de MENDOZA, 2016.

A maior prevalência ocorre na Tailândia, onde a doença é endêmica devido às condições climáticas. Também há relatos de casos vindos da Austrália, Estados Unidos, Israel e China, indicando que o microrganismo possa estar mais amplamente distribuído e provavelmente é subdiagnosticado e subnotificado (AGARWAL *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2016; MILER, 1983; IMWIDTHAYA, 1994; SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989; AGARWAL *et al.*, 2019).

### 1.3. Ceratites por *Pythium insidiosum*

#### 1.3.1. Fatores de risco

Os principais fatores de risco relacionados com infecção corneana por *P. insidiosum* são utilização de lentes de contato, trauma ocular (HE *et al.*, 2016), lesões com poeira, contato com água (RATHI, 2018) ou ambientes úmidos (esgoto, campos de plantação de arroz, piscina, água de torneira e rios) (LELIEVRE *et al.*, 2015) e habitação agrícola (LELIEVRE, *et al.*, 2015; RATHI *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019). A maioria dos indivíduos acometidos pela doença são trabalhadores agrícolas (LELIEVRE *et al.*, 2015) ou pescadores (RATHI *et al.*, 2018).

Acredita-se que a combinação de fatores como uso de lentes de contato e contato com água, pode aumentar o risco de ceratite por *Pythium* (HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015; RATHI *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019).

Há um relato que permite supor que o uso de terapia anti-fator de necrose tumoral pode contribuir com a infecção ocular inicial ou com a falha do tratamento não cirúrgico empregado (HUNG e LEDDIN, 2014).

Nos pacientes acometidos por pitiose ocular o contato direto com o patógeno é provavelmente o primeiro passo para a instalação da infecção (RATHI *et al.*, 2018; HUNG e LEDDIN, 2014; HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015). Nos casos até então relatados de ceratite por *Pythium* os pacientes que eram usuários de lentes de contato tiveram contato com água potencialmente contaminada (rio, água de torneira e piscina) (HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015; RATHI *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019).

### **1.3.2. Manifestações clínicas e evolução**

A apresentação clínica das ceratites por *Pythium insidiosum* se inicia com quadros leves de fotofobia, hiperemia conjuntival, dor e sensação de corpo estranho seguidos de piora da acuidade visual (RATHI *et al.*, 2018; HUNG e LEDDIN, 2014; HE *et al.*, 2016). Os sintomas normalmente se iniciam dias a semanas após trauma vegetal (HE *et al.*, 2016) ou contato com água contaminada (RATHI *et al.*, 2018; HUNG e LEDDIN, 2014).

O quadro progride rapidamente para úlcera corneana grave e extensa que acomete até o limbo, podendo haver comprometimento até a esclera e acometimento da musculatura extraocular (RATHI *et al.*, 2018; HUNG e LEDDIN, 2014; LELIEVRE *et al.*, 2015). A biomicroscopia mostra injeção conjuntival severa (LELIEVRE *et al.*, 2015), úlcera de córnea com denso infiltrado, necrose e afinamento estromal (Figura 1.4) (RATHI *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015) podendo haver formação de placas endoteliais (Figura 1.5.E) (HE *et al.*, 2016). O exame da câmara anterior mostra intensa reação inflamatória e hipópico (RATHI *et al.*, 2018; LELIEVRE *et al.*, 2015). Os pacientes



podem referir dor excruciante, e podem também apresentar achados como ceratoneurite radial (Figura 1.5. B) (HE *et al.* 2016) e anel estromal imune (LELIEVRE *et al.*, 2015). A infecção pode se estender para todo o segmento anterior (RATHI *et al.*, 2018; HUNG, 2014; LELIEVRE *et al.*, 2015), posterior (RATHI *et al.*, 2018) ou até mesmo comprometimento orbitário (HUNG e LEDDIN, 2014; AGARWAL *et al.*, 2019).

A acuidade visual inicial na apresentação pode variar de 20/120 a 20/400 (RATHI *et al.*, 2018) e evolui com deterioração rápida para até percepção de luz (RATHI *et al.*, 2018; LELIEVRE *et al.*, 2015).

A lesão corneana piora mesmo após instituição de tratamento clínico, frequentemente evoluindo com descemetocelose (Figura 1.5.E) (HE *et al.*, 2016), perfuração ocular (Figura 1.5 F) (RATHI *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2016) e prolapso uveal-lenticular-vítreo (RATHI *et al.*, 2018). Após tratamento cirúrgico com ceratoplastia lamelar ou penetrante, os pacientes terminam por apresentar opacidade corneana difusa com neovascularização e conjuntivalização (Figura 1.5. G e H) (HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015). Em alguns casos há necessidade de tratamento cirúrgico mais agressivo como evisceração ou enucleação do bulbo ocular (LELIEVRE *et al.*, 2015), quando a cirurgia é realizada para controle do processo infeccioso. Entretanto, ainda assim, há relatos de pacientes que evoluíram com tromboflebite do seio cavernoso refratária ao tratamento clínico e cirúrgico, seguida de óbito (RATHI *et al.*, 2018); (AGARWAL *et al.*, 2019).

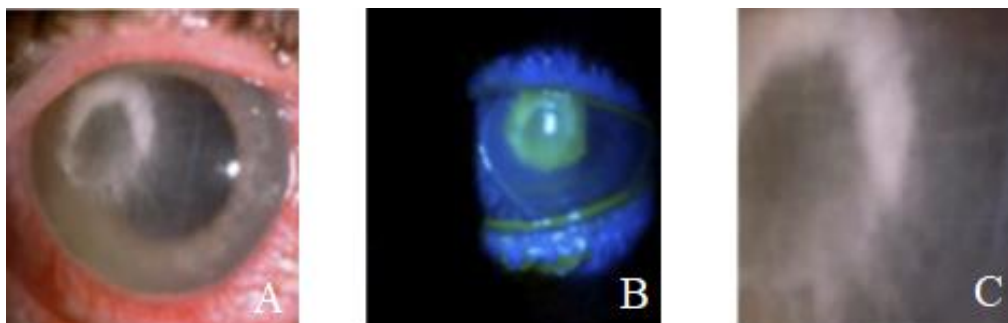


Figura 1.4. (A) úlcera corneana paracentral com denso infiltrado estromal. (B) coloração com fluoresceína em úlcera de córnea paracentral. (C) Maior aumento mostra infiltrado estromal de padrão reticulado. Fonte: LELIEVRE *et al.*, 2015.

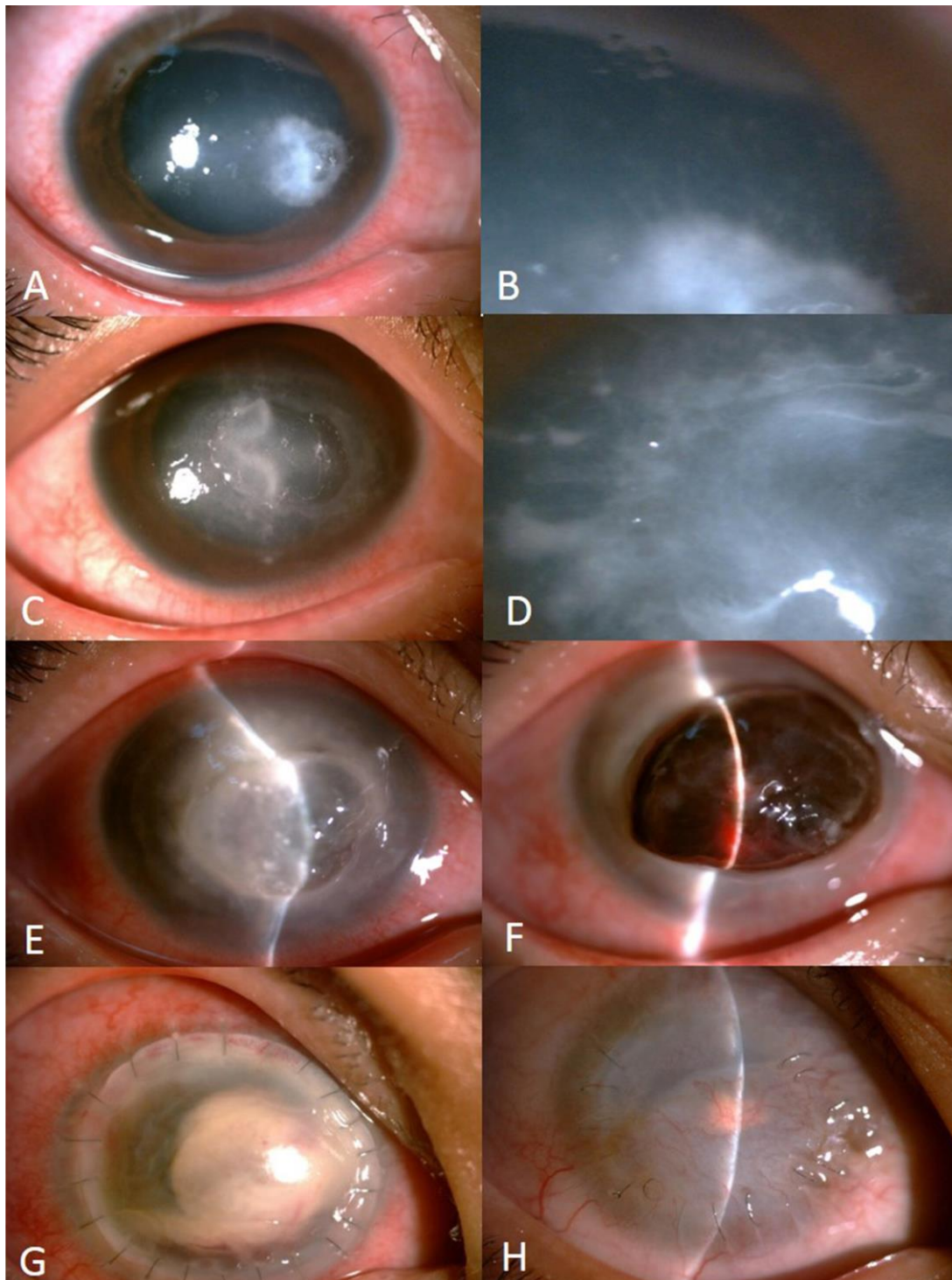


Figura 1.5. (A) úlcera estromal em periferia nasal da córnea cercada por infiltrado estromal difuso. (B) Ceratoneurite radial. (C) Necrose estromal e infiltrado de aspecto flocular. (D) Infiltrados numulares e ramificados. (E) *Melting* corneano com formação de descemetocel e placas endoteliais (F) Perfuração corneana com prolapso da íris. (G) Câmara anterior com exsudato brancacento após ceratoplastia penetrante e lavagem de câmara anterior. (H) Aspecto da córnea 3 meses após ceratoplastia penetrante. Conjuntivalização e neovascularização extensos. Fonte: HE *et al.*, 2016.

### 1.3.3. Diagnóstico e Propedêutica

A acurácia na distinção entre *P. insidiosum* e fungos com a utilização de história médica, sinais e sintomas clínicos, biomorfologia no raspado úmido, cultura microbiológica, coloração histoquímica e microscopia confocal é limitada (HE *et al.*, 2016).

As ferramentas moleculares baseadas no PCR e nas técnicas de avaliação genética são os principais métodos utilizados para a identificação do patógeno. Os principais genes amplificados e seq, 5.8 S rRna e exo-1,3-β-Glucanase (HE *et al.*, 2016), sequenciados pelo PCR, para a detecção de *P. insidiosum* são ITS1, ITS2.

Uma revisão do perfil microbiológico das ceratites, abrangendo uma década (1991-2000), no sul da Índia demonstrou que 10 a 13% dos fungos isolados foram morfologicamente não identificados devido a esporulação insuficiente, esses poderiam ser casos de *P. insidiosum*. (RATHI *et al.*, 2018). O diagnóstico é frequentemente definido de maneira errônea como ceratite fúngica e poder ser comprovado como pitiose após a realização de PCR (RATHI *et al.*, 2018, HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015).

#### 1.3.3.1. Propedêutica complementar

A ultrassonografia ocular pode exibir pequena quantidade de exsudato vítreo (RATHI *et al.*, 2018).

A microscopia confocal é um exame útil para auxiliar o diagnóstico, demonstrando hifas ramificadas (RATHI *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015), numerosos filamentos com alta refringência espalhados envolvendo toda a espessura corneana (Fig. 1.6), organizados de maneira sinuosa e padrão de ramificação irregular formando formatos em “X”, “Y” e “S” (Figura 1.7) (HE *et al.*, 2016). Segundo HE e colaboradores é possível identificar filamentos corneanos organizados irregularmente com medidas de 3-5µm de largura e 200–400µm de comprimento (alguns maiores que 400µm). Ademais, comparativamente com hifas fúngicas, o *P. insidiosum* exhibe padrões mais flexíveis, algumas não possuem ramificações, no entanto, a maioria é ramificada

em ângulos retos, mostrando um padrão em “Y”. É possível, também, em casos menos frequentes encontrar padrões em “X” (HE *et al.*, 2016).

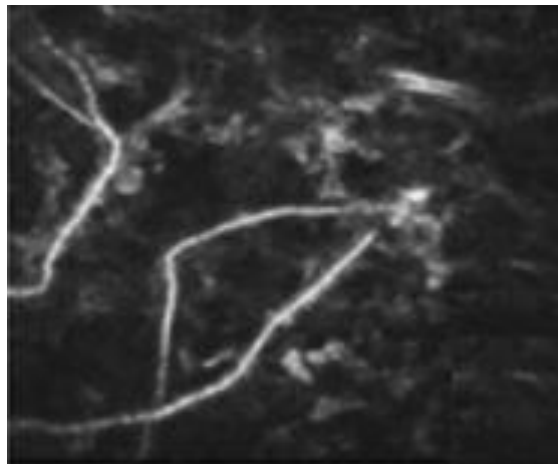


Figura 1.6. Microscopia confocal: estruturas ramificadas altamente reflexivas que se assemelham a hifas fúngicas. Fonte: LELIEVRE *et al.*, 2015.

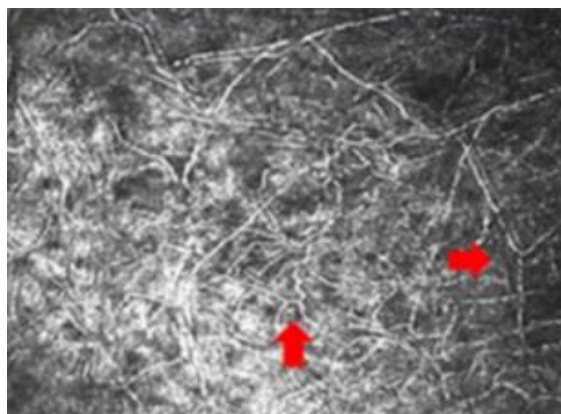


Figura 1.7. Morfologia dos filamentos em córnea infectada no exame de microscopia confocal *in vivo*. Os filamentos irregulares se distribuem em padrões diversos. As setas vermelhas mostram os filamentos em formatos de “X” e “Y” Fonte: HE *et al.*, 2016.

### 1.3.3.2. Diagnóstico laboratorial

O *P. insidiosum* não se cora bem com hematoxilina-eosina o que torna sua identificação dificultada (HUNG e LEDDIN, 2014).

No exame a fresco de material obtidos de raspados de córnea com KOH é possível detectar hifas septadas ramificadas (RATHI *et al.*, 2018), que podem ser vistos como na Figura 1.8.

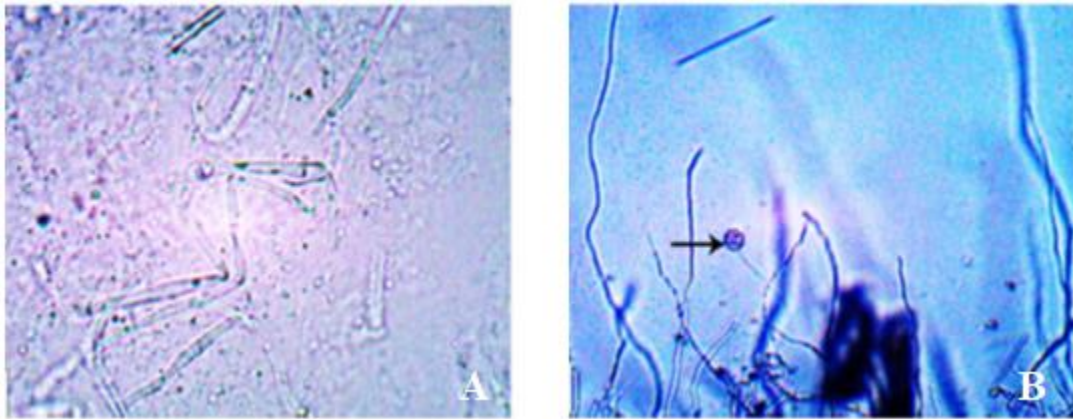


Figura 1.8. (A) Raspado de córnea com KOH a 10% mostrando hifas hialinas longas e delgadas de *P. insidiosum* com septações esparsas. Observam-se ainda numerosas vesículas dentro das hifas. (B) Vesícula contendo zoósporos Fonte: GURNANI *et al.*, 2021.

Assim como outros oomicetos, *P. insidiosum* cresce relativamente bem em uma variedade de meios. Há relato de crescimento em ágar chocolate (HE *et al.*, 2016). A cultura microbiológica realizada em ágar Sabouraud demonstra bordas hifadas com padrões de crescimento submerso e presença de micélios aderidos ao ágar. São de coloração amarela-esbranquiçadas, com característica úmida, margens filiformes e aspecto cremoso (RATHI *et al.*, 2018; HE *et al.* 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015).

Em cultivos em placa com ágar batata, a colônia se mostra opaca, de coloração branco-amarelada com margens filiformes (Figura 1.9 A e B).



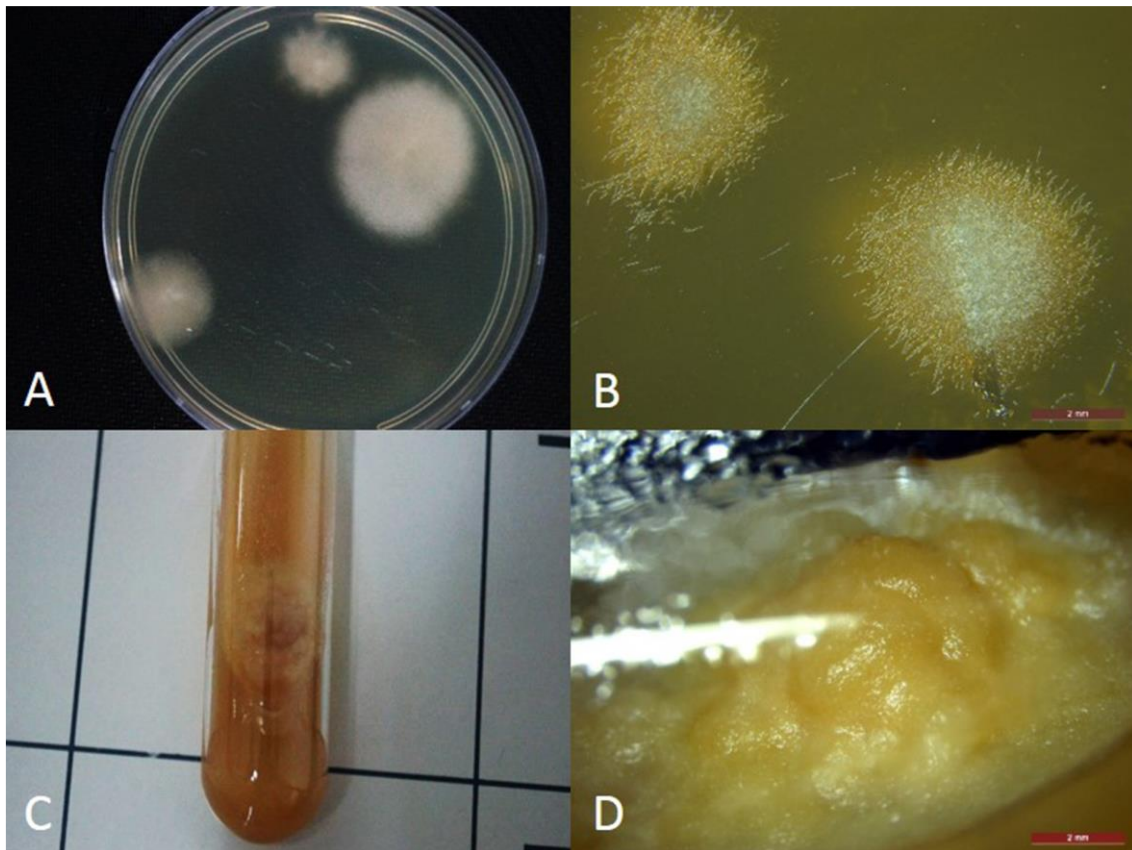


Figura 1.9. Morfologias de *P. insidiosum* cultivados em uma placa de Petri (A, B) e em um tubo de ensaio (C, D) contendo ágar batata dextrose. (B) Os crescimentos branco-amarelados na placa apresentam forma plana e filamentosa. (D) *P. insidiosum* no tubo apresenta formas arredondadas e convexas. Fonte: HE *et al.*, 2016.

Os zoósporos compõem sinais valiosos para a identificação de *P. insidiosum*, mas não podem ser detectados no sistema de cultura com ágar; no entanto, podem ser encontrados em cultura de meio líquido ou em água contendo agentes antibióticos e cabelo humano (HE *et al.*, 2016) ou solução de esporulação (MENDOZA e PRENDAS, 1988). Nestes dois veículos, segundo HE e colaboradores, a parte superior dos filamentos formam esporângios que são liberados como zoósporos (Figura 1.10), que se movem para aderir à superfície do cabelo. Entretanto, é relevante ressaltar que a formação de zoósporos biflagelados não é específica do *P. insidiosum*, mas uma característica de outras espécies de *Pythium* e *Lagenidium* (HE *et al.*, 2016).

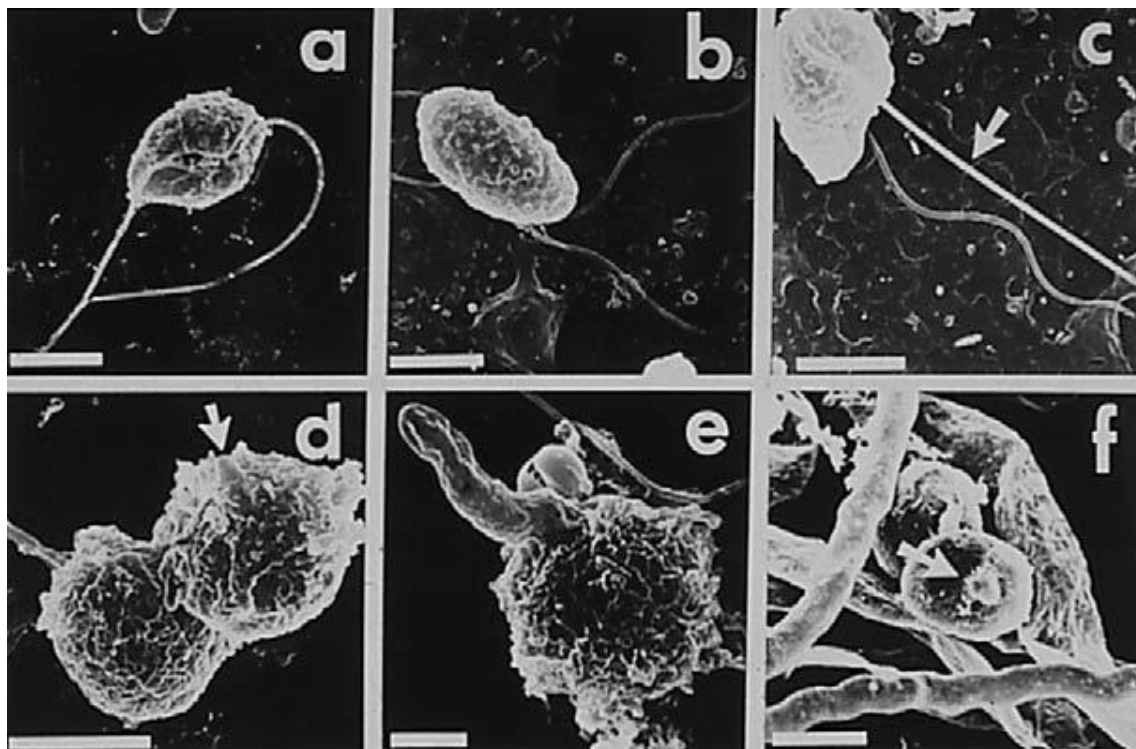


Figura 1.10. Microscopia eletrônica de transmissão dos zoósporos móveis de *Pythium insidiosum* (a–c). Zoósporos encistados são caracterizados pela sua morfologia globosa (d–f). As setas indicam os locais que eram ocupados por flagelos. Uma substância amorfa usada para ligar os zoósporos ao tecido do hospedeiro é evidente na superfície dos zoósporos encistados. Zoósporos que se distanciam das folhas ou tecidos animais não secretam este material amorfo. Reproduzido com permissão de MENDOZA e HERNANDEZ e AJELLO, 1993.

Nos casos de ceratite, a histopatologia da córnea infectada é identificada necrose e hemorragia nas áreas com inflamação granulomatosa (RATHI *et al.*, 2018). Na impregnação com metanamina prata foram identificadas hifas septadas e ramificadas (RATHI *et al.*, 2018; LELIEVRE *et al.*, 2015). No exame histopatológico coloração dos filamentos de *P. insidiosum* foi positiva para laranja de acridina e lactofenol azul (RATHI *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2016). Os filamentos eram caracterizados com parede celular espessa, septos esparsados, com vesículas internas (HE *et al.*, 2016). No final de alguns filamentos podem ser encontradas estruturas em formato de placas, assumindo-se que se trata de liberação de esporângios.

Segundo AGARWAL, 2018, a coloração com iodeto de potássio – ácido sulfúrico (KI-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) demonstrou ser simples, sensível, específico e com bom custo-benefício para a identificação do patógeno em questão e na sua diferenciação com microrganismos fúngicos. Sua utilização na prática clínica está sendo explorada.

A coloração de Grocott, com metamina prata, de tecido corneano revela hifas esparsamente septadas, sugerindo fungo que falhou no crescimento da cultura (LELIEVRE *et al.*, 2015) (Figura 1.11).

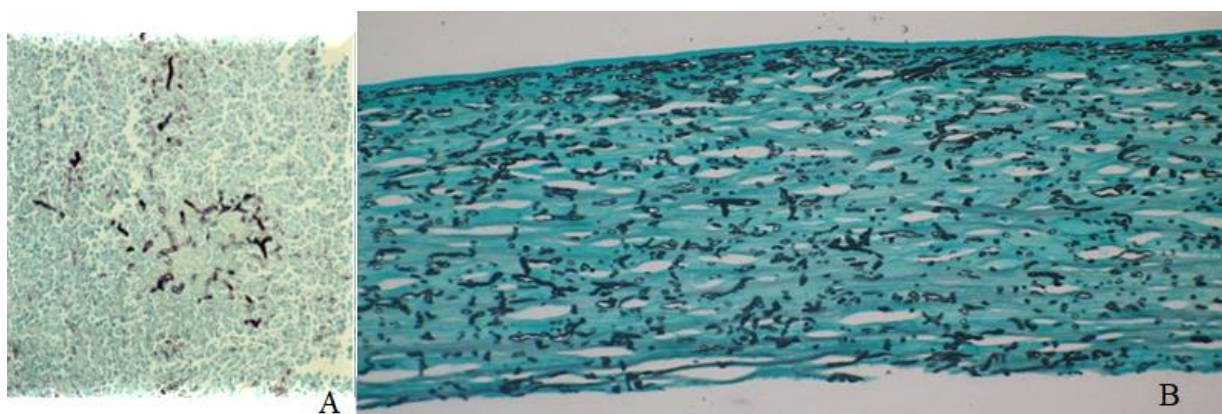


Figura 1.11. A: Tecido corado com metamina prata evidenciando hifas coradas dispersas no estroma. B: Fragmento de córnea corada com metamina prata evidenciando hifas coradas acometendo toda extensão corneana. Fonte: LELIEVRE *et al.*, 2015.

A imagem a seguir (Figura 1.12) mostra a correlação clinicopatológica de uma infecção corneana por *P. insidiosum*.

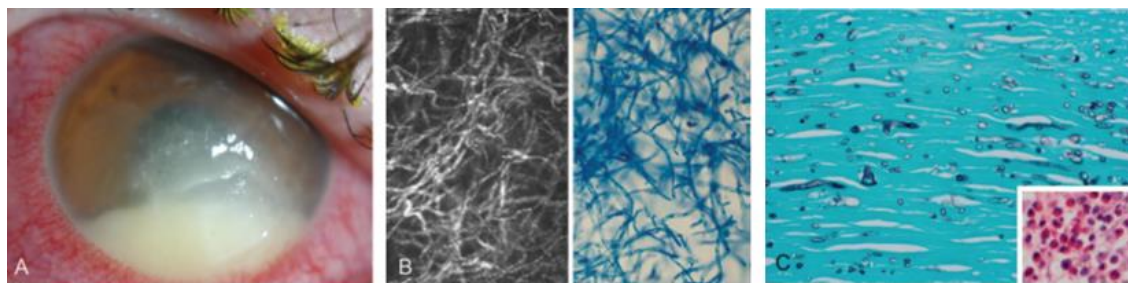


Figura 1.12. (A) Biomicroscopia com aspecto da úlcera de córnea. (B) Microscopia confocal: estruturas hiperrefletivas e ramificadas (esquerda), correlacionando-se a hifas esparsamente septadas e ramificadas vistas à microscopia (direita) - (coloração lactofenol azul). (C) Exame histológico da córnea: hifas amplas e ramificadas em todo o estroma da córnea (coloração Metanamina prata e numerosos eosinófilos dentro da câmara anterior (inserção, hematoxilina e eosina). Fonte: TANHEHCO *et al.*, 2011.



#### 1.3.4. Tratamento

O tratamento das ceratites por *P. insidiosum* se baseia em uma combinação de estratégias que envolvem tratamento clínico medicamentoso, tratamento cirúrgico e imunoterapia. As drogas utilizadas incluem polienos tópicos, azóis tópicos e sistêmicos e equinocandinas. Utilizam-se ainda drogas antibióticas para profilaxia de infecção bacteriana secundária e agentes cicloplégicos (RATHI *et al.*, 2018).

Em todos os casos relatados de ceratite por *Pythium* o tratamento clínico isolado não foi capaz de curar a infecção (RATHI *et al.*, 2018; HUNG e LEDDIN, 2014; HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015). *P. insidiosum* responde mal aos agentes antifúngicos convencionais sistêmicos e tópicos por não possuir o ergosterol, alvo do fármaco, em sua membrana citoplasmática. Entretanto, as equinocandinas, agentes antifúngicos que inibem a síntese de  $\beta$ -glucana da parede celular, podem ser eficazes no tratamento de pitiose. Um alto índice de suspeita deve ser mantido para *P. insidiosum* em casos com suspeita de etiologia fúngica que não responde ao tratamento (RATHI *et al.*, 2018).

Devido à natureza agressiva e profundamente invasiva do *P. insidiosum*, o desbridamento cirúrgico do tecido infectado em associação com antifúngicos parece ser o único tratamento eficaz (HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015).

Há relatos de associação de tratamento tópico com uso de antimicrobianos associado ao uso de cola de cianoacrilato e/ou lentes de contato terapêuticas, especialmente em casos com afinamento corneano e melting (Figura 1.13) (GURNANI *et al.*, 2021; ROMERO *et al.*, 2009)

Nos casos em que o diagnóstico oportuno é feito e a infecção é limitada à córnea, a ceratoplastia penetrante terapêutica pode ser suficiente (Figura 1.14). Entretanto, pode haver recidiva da infecção no enxerto (LELIEVRE *et al.*, 2015).

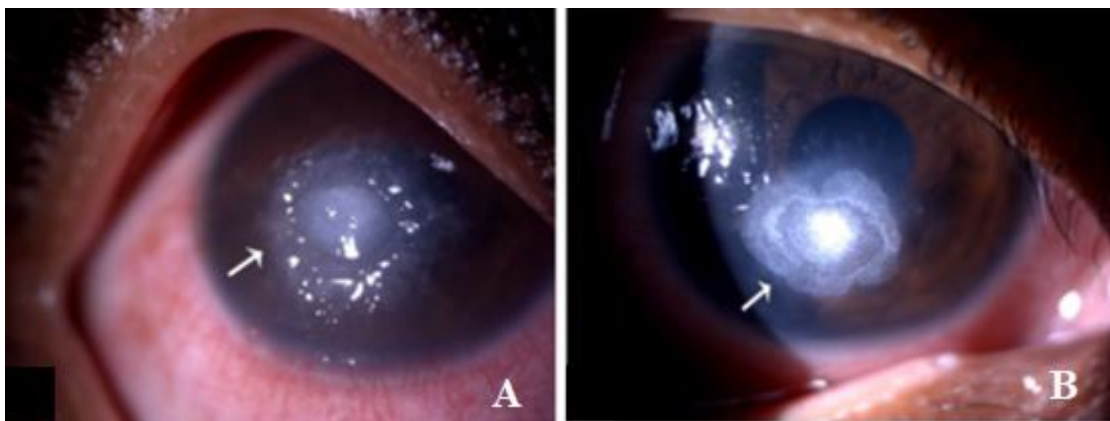


Figura 1.13. (A) Infiltrados com afinamento do estroma nas bordas, (B) após aplicação e cola de cianoacrilato e cicatrização parcial do tecido. Fonte: GURNANI *et al.*, 2021.



Figura 1.14. Ceratoplastia penetrante com bom resultado após seis meses pós-operatório. Fonte: LELIEVRE *et al.*, 2015.

Imunoterapia na forma de vacina administrada por via subcutânea tem um possível papel adjuvante no tratamento e pode prevenir a recorrência em pacientes pós-ceratoplastia. (RATHI *et al.*, 2018; LELIEVRE *et al.*, 2015). Foi postulado que uma mudança na resposta imune do hospedeiro de um T-helper 2 (durante a infecção) a uma resposta imune Th1 (após a vacinação) está por trás das propriedades da vacina (LELIEVRE *et al.*, 2015).

Entretanto, quando há extensão profunda da infecção o tratamento cirúrgico radical precoce na forma de evisceração ou exenteração é de extrema importância (RATHI *et al.*, 2018; HUNG e LEDDIN, 2014; LELIEVRE *et al.*, 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

A pitiose conserva características micro-morfológicas muito semelhantes às doenças causadas por fungos. No casos das ceratites, a pitiose simula perfeitamente ceratites causadas por fungos, sendo impossível diferenciá-las pelo exame clínico e exames oftalmológicos complementares existentes. O principal desafio da abordagem para a Pitiose ocular reside no fato de ser diagnosticada erroneamente e tratada como uma infecção fúngica. Isso ocorre não apenas por causa da falta de conhecimento dos médicos oftalmologistas e patologistas, mas devido a sua semelhança morfológica com fungos. Além disso, a falta de métodos diagnósticos eficazes, com sensibilidade e especificidade adequadas é outro fator dificultador na identificação adequada desse agente.

Portanto, o diagnóstico de *P. insidiosum* é um desafio, uma vez que não há características clínicas patognomônicas para distinguir esta infecção de outras ceratites fúngicas. Neste cenário, é imperativo que os profissionais estejam adequadamente treinados e equipados para identificar com precisão o *Pythium* em todas as amostras de laboratório, incluindo as peças ressecadas cirurgicamente.

Uma vez que é relativamente raro, difícil de distinguir clinicamente, microbiológica e histopatologicamente da ceratite fúngica com culturas de crescimento lento, requerendo sequenciamento de DNA para identificação, este organismo pode iludir o oftalmologista e ser negligenciado na prática clínica.

Ao avaliar amostras de ceratite provenientes da Índia e identificar o agente etiológico dessas como microrganismos do gênero *Pythium*, demonstra-se a existência de possível subdiagnósticos dos casos de ceratite. O presente estudo tem finalidade de exibir a possibilidade de pitiose em casos de ceratites consideradas fúngicas, mas não responsiva aos tratamentos convencionais. Dessa maneira contribuirá para abrir o leque de possibilidades diagnósticas dos casos de ceratites graves, colocando como hipótese diagnóstica a infecção por *Pythium*. Ao apresentar a relevância de se realizar a diferenciação diagnóstica, espera-se expor a importância da capacitação médica e tecnológica dos serviços.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar as características moleculares e filogenéticas dos isolamentos de *P. insidiosum* nas amostras coletadas em casos de ceratite em pacientes da Índia.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Avaliação das amostras das culturas enviadas da Índia suspeitas de infecção por *Pythium insidiosum*.

Extração de DNA dos isolamentos de *P. insidiosum* para realização de PCR com sequenciamento de DNA das amostras dos pacientes infectados.

Alinhamento utilizando o programa MEGA 10 e MEGA7 (KUMAR *et al.*, 2016), algoritmo subtree-pruning-regrafting (SPR) das amostras sequenciadas.

Caracterização filogenética das amostras de isoladas dos pacientes positivos utilizados no estudo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta do material de casos de ceratite por *P. insidiosum* na Índia

Foram avaliados quatorze isolamentos de *P. insidiosum* obtidos de casos de ceratite no *Aravind Eye Hospital*, situado na cidade de Coimbatore, localizada na região de Peelamedu, ao sul da Índia, no período de um ano, entre 2017 e 2018. A fotografia e a localização do Hospital onde foram feitas as coletas é mostrada na Figura 4.1. Esses casos avaliados apresentavam suspeita de infecção por *P. insidiosum* devido a resposta ineficaz aos tratamentos fúngicos convencionais e à característica morfológica das culturas dos agentes. Em casos de *Pythium*, a cultura demonstra padrão aderido com micélios submersos no ágar, úmida, coloração branco-amarelada com margens filiformes e cremosa.

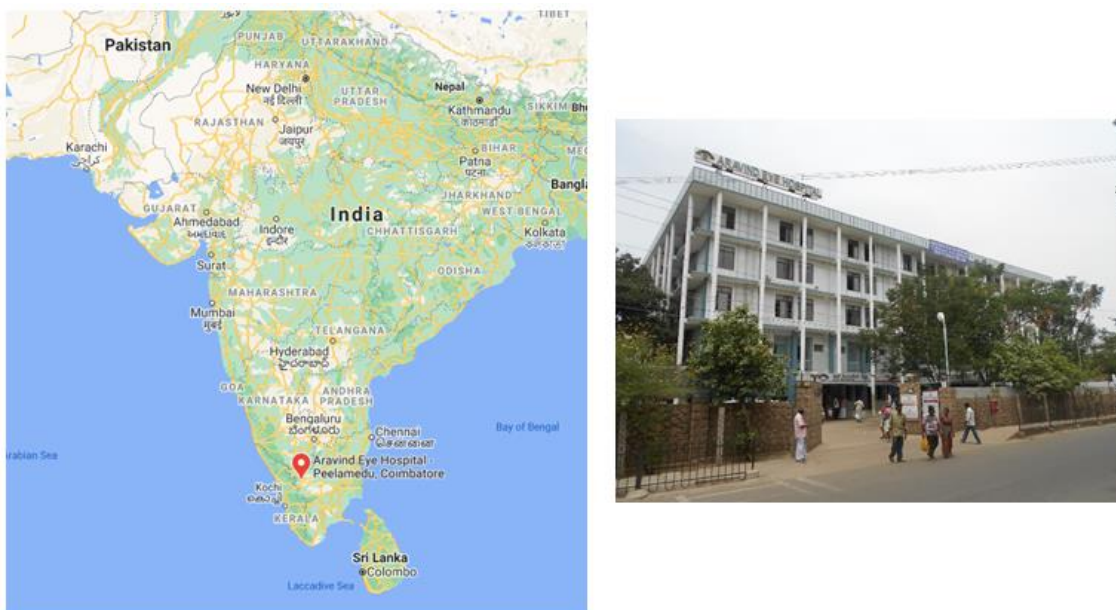


Figura 4.1. Local de coleta das amostras doadas para realização do presente estudo e sua localização geográfica. Fonte: Google, INC. Google Maps, 2021.

### 4.2. Cultivo das amostras clínicas

As amostras do estudo são originadas da Índia e foram doadas ao Biomedical Laboratory Diagnostic (BLD), Michigan State University, Estados Unidos da América, em placas de Petri de ágar Sabouraud. Foi realizado, então, o replantio das mesmas em novas placas contendo ágar Sabouraud e em frascos

contendo 40mL de caldo de dextrose Sabouraud 2% (SDB) incubados por 72 h a 25°C em um agitador rotativo a 150 rpm (VILELA e VISWANATHAN e MENDOZA, 2015). O material de cultivo foi visualizado microscopicamente utilizando azul de lactofenol (fenol 20g, ácido láctico 20g, glicerina 40g, azul de lactofenol 0,05g, água destilada 20mL). Esse procedimento é mostrado na Figura 4.2.

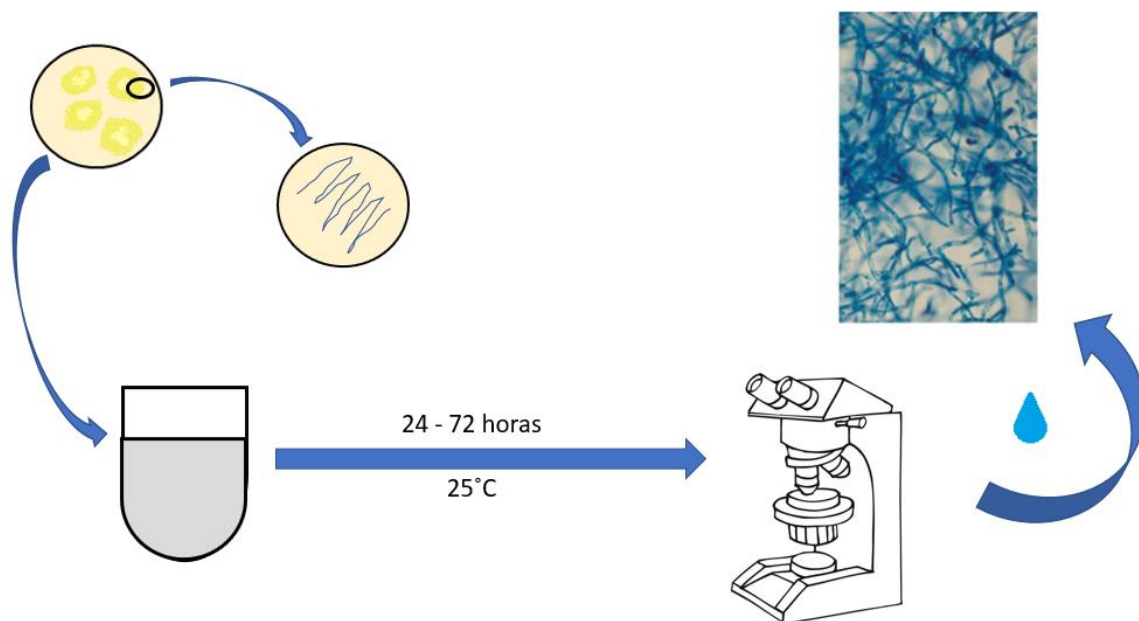


Figura 4.2. Desenho esquemático do procedimento de cultivo e avaliação com lactofenol azul.

### 4.3. Zoosporogênese

A indução a zoosporogênese do *P. insidiosum* foi realizada utilizando o protocolo de MENDOZA e PRENDAS, 1988. Procedeu-se com a seleção de apenas uma colônia derivada da cultura em ágar Sabouraud dextrose 2% (ASD) garantindo, dessa forma, a homogeneidade das culturas estudadas. Essas colônias foram replantadas e utilizadas para a realização do estudo. Os isolados foram replantados em novas placas de Petri de ASD e levados para incubação a 25°C por 24 horas. Esse método utilizado para induzir a zoosporogênese pode ser melhor compreendido pelo desenho esquemático da Figura 4.2.

Após a incubação, pequenos fragmentos de grama, de 4 x 10 mm, obtidos das bordas de avanço, previamente autoclavados, foram adicionados na superfície do ágar. Esse conjunto foi novamente colocado para incubação de 25°C por 24-72 horas. Dessa maneira, o microrganismo é capaz de colonizar a superfície do vegetal. Então, as lâminas de grama foram colocadas em béqueres contendo 50mL de mistura para esporulação. Essa mistura foi feita a partir de duas soluções: a primeira contendo 66,04g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 68,05g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 87,09g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  em 500mL de água; a segunda contendo 18,38g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 25,42g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em 250mL de água. As duas soluções foram autoclavadas separadamente e armazenadas em temperatura ambiente até o uso. A mistura de esporulação foi preparada com 0,5mL da primeira solução e 0,1mL da segunda solução em 1L de água destilada esteril. Béqueres contendo 50mL dessa mistura diluída de esporulação e lâminas de gramas parasitadas foram incubadas a 25°C. O desenvolvimento dos esporângios e zoósporos foram avaliados microscopicamente a cada 30 minutos de intervalo por seis ou mais horas.

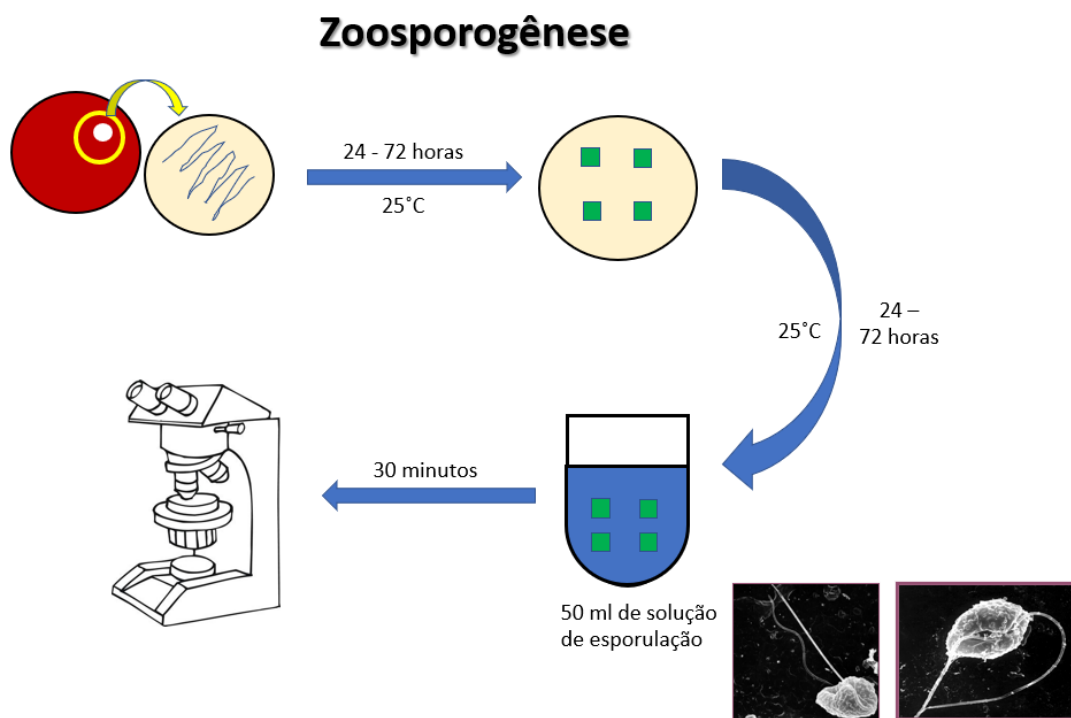


Figura 4.3. Desenho esquemático do mecanismo de zoosporogênese utilizado.

#### 4.4. Extração de DNA e PCR dos cultivos do *P. insidiosum*

Após incubação, as culturas foram inativadas com timerosal (0,02%, p/v) (Eli Lilly, Toronto, Ontário). As hifas foram recuperadas por filtração, transferidas para um almofariz, congeladas com nitrogênio líquido e, então, trituradas. O DNA das hifas interrompidas foi tratado com dodecil sulfato de sódio, proteinase K e RNase (Roche Diagnostic, Indiana), e depois incubado a 65°C durante 1 hora. Em seguida, o DNA genômico foi extraído com fenol, clorofórmio e álcool absoluto (Sigma, St. Louis, Missouri) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). O DNA foi resuspenso em 100mL de água destilada ultrapura e mantida a -80°C até ser utilizada.

#### 4.5. Amplificação dos Internal Transcriber Spacers (ITS) e da subunidade II (COXII) do citocromo c oxidase

A amplificação por PCR foi realizada da região ITS. O procedimento foi com início a quente usando *primers* ITS1 e ITS4 universais (GARGAS e DEPRIEST, 1996). Os *amplicons* de PCR foram ligados ao vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia), purificados e sequenciados usando a química do *BigDye Terminator* em um analisador genético ABI Prim 310 (Perkin-Elmer, Foster City, Califórnia). Pelo menos três clones por ligação foram sequenciados em ambas as direções usando os iniciadores M13F e M13R. Os *amplicons* foram clonados para manter registros congelados do DNA amplificado.

A amplificação por PCR foi realizada do gene parcial da subunidade II (COXII) do citocromo c oxidase. O procedimento foi com início a quente usando *primers* específicos de COXII (COX.LagF = 5'-CCACAAATTTCACTACATTGA-3' e COX.LagR = 5' -TAGGATTTCAAGATTCCT-GC-3) usado por Mendoza e colaboradores, 2016. Os *amplicons* de PCR foram ligados ao vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia), purificados e sequenciados usando a química do *BigDye Terminator* em um analisador genético ABI Prim 310 (Perkin-Elmer, Foster City, Califórnia). Pelo menos três clones por ligação foram sequenciados em ambas as direções usando os iniciadores M13F e M13R. Os *amplicons* foram clonados para manter registros congelados do DNA amplificado.



#### 4.6. Análises filogenéticas utilizando as sequências de ITS e COXII

As sequências ITS e COXII dos isolados das amostras evidenciadas na Tabela 5.1 foram alinhadas e analisadas independentemente e, em combinação com as sequências ITS e COXII de *Lagenidium*, *Pythium* e outras espécies de Saprolegniales disponíveis no *GenBank*. Quatorze sequências de DNA COXII e quatorze ITS (números de acesso NCBI na Tabela 5.1) produzidas neste estudo foram alinhadas com sequências de Oomycota de DNA de 63 ITS e 42 COXII do *GenBank* usando CLUSTAL W 1.81 e MUSCLE (MENDOZA *et al.*, 2016) com configurações padrão seguidas por uma inspeção visual. Traços (-) foram usados para anotar dados de nucleotídeos ausentes. O Oomycota está dividido em dois grupos principais: Os Peronosporales (compreendendo: *Lagenidium*, *Paralagenidium*, *Phytophthora*, *Pythiogeton*, *Pythium* e outros) e os Saprolegniales (compreendendo: *Aplanes*, *Achlya*, *Aphanomyces*, *Leptolegnia*, *Saprolegnia* e outros). Assim, selecionamos as Saprolegniales *Achlya* e *Saprolegnia* como membros do grupo externo.

As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA 10 (KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K., 2016). A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de *bootstrap* (1000 replicatas) é relatada (FELSENSTEIN, J., 1985). A análise de *Neighbor Joining* (NJ) foi feita no MEGA7 usando o algoritmo *subtree-pruning-regrafting* (SPR) (NEI, M.; KUMAR, S., 2000) com nível de pesquisa 1, no qual as árvores iniciais foram obtidas por adição aleatória de sequências (1000 repetições). Os comprimentos dos ramos resultantes foram calculados usando o método do caminho médio (NEI, M.; KUMAR, S., 2000) e em unidades de número de mudanças ao longo de toda a sequência. A análise envolveu 77 sequências de nucleotídeos ITS e 56 sequências de COXII. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do *site* foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de lacunas de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas eram permitidas em qualquer posição.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Cultura

A partir do material enviado da Índia foram realizados novos plantios em ágar Sabouraud no BLD na MSU. Todas as amostras demonstraram padrões de crescimento com grande adesão ao meio de cultura pela presença de micélios submersos, com cor branco-amarelada, característica úmida, margens filiformes e aspecto cremoso, como pode ser visto na Figura 5.1. Verificou-se que houve produção de zoósporos em meio aquoso em todos os isolamentos investigados neste estudo, sugerindo que de fato se tratava de isolamentos de *P. insidiosum*.



Figura 5.1. Padrão de crescimento após plantio em ágar Sabouraud.

### 5.2. Aspectos Microscópicos

Foram avaliados pequenos fragmentos de cada isolamento estudado, corados com lactofenol azul e visualizados sob microscopia óptica. Observaram-se hifas não septadas ou, algumas raras vezes, pouco septadas, com ausência de ramificações e, nos raros casos em que estas ocorreram, apresentaram-se como ramificações em diversos padrões irregulares.

### 5.3. Sumarização de Dados Clínicos

A partir dos dados clínicos recebidos dos pacientes que tiveram as suas amostras avaliadas, foi desenvolvida uma tabela (Tabela 5.1), destacando os seguintes parâmetros: idade, sexo, história de contato com água e ocupação.

A coleta dos referidos dados foi realizada no primeiro atendimento dos pacientes no momento de sua admissão com o quadro ocular. Ocorreram *Aravind Eye Hospital* e os dados coletados entre 2017 e 2018 foram cedidos juntamente com as amostras estudadas.

<b>AMOSTRA</b>	<b>IDADE</b>	<b>SEXO</b>	<b>CONTATO COM AMBIENTE AQUÁTICO</b>	<b>OCUPAÇÃO</b>
India_3	18	M	Sim	Estudante
India_4	32	M	Sim	Agricultor
India_8	20	M	Sim	Fazendeiro
India_9	42	F	Sim	Dona de casa
India_10	31	M	Sim	Comerciante
India_11	43	F	Sim	Dona de casa
India_12	46	F	Sim	Dona de casa
India_13	20	M	Sim	Pescador
India_14	36	F	Sim	Agricultora
India_15	35	M	Sim	Lavrador
India_16	42	F	Sim	Dona de casa
India_17	19	M	Sim	Agricultor
India_18	38	M	Sim	Pescador
India_19	26	F	Sim	Dona de casa

Tabela 5.1. Padrão epidemiológico dos pacientes de acordo com os parâmetros idade, sexo, história de contato com água e ocupação.

#### 5.4. PCR dos isolamentos

Na Figura 5.2, é apresentado o resultado da eletroforese em gel de agarose de amplificação por PCR das sequências de rDNA de *P. insidiosum* e controles. Verifica-se tamanhos semelhantes em todas as amostras analisadas ao serem comparadas ao controle.

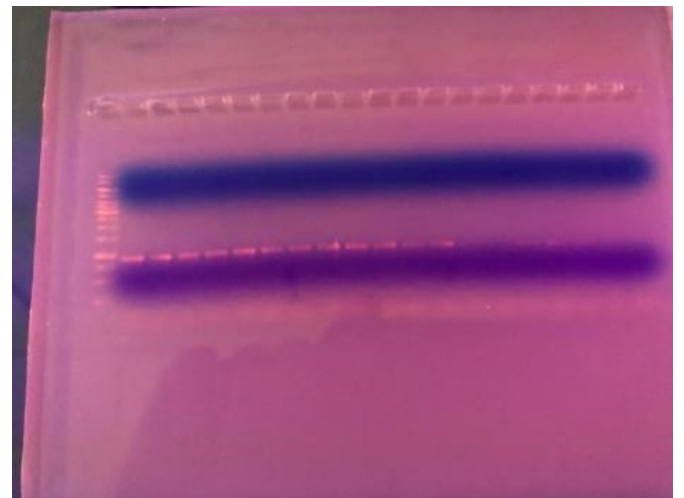
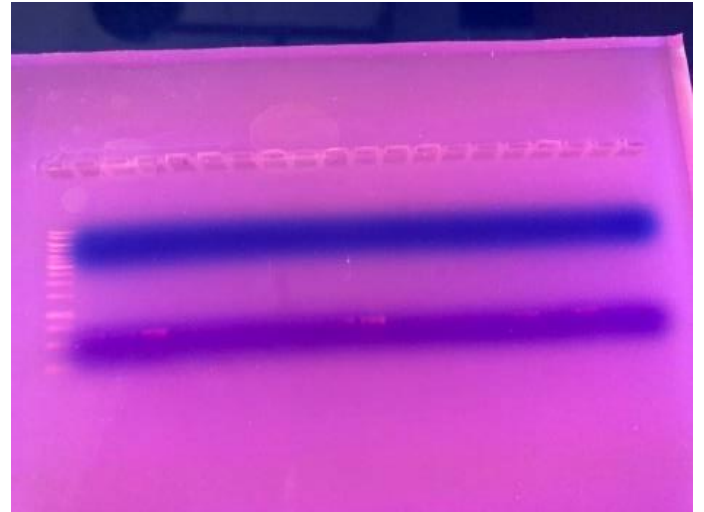
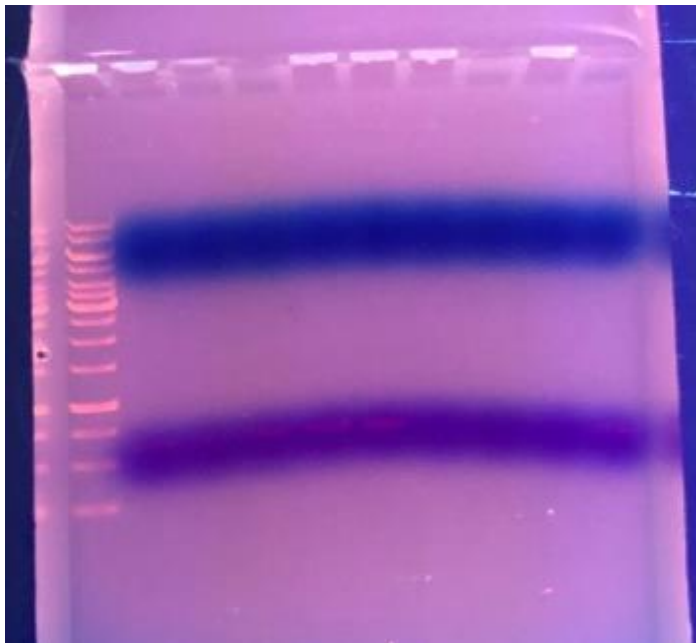


Figura 5.2. PCR das amostras de DNA obtidas dos isolamentos colorido com brometo de etídio.

## 5.5. Análise Filogenética

A história evolutiva foi inferida usando o método computacional *Neighbor joining* (NJ). A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste com *bootstrap* de 1000 réplicas são mostradas ao lado das divisões internas (FELSENSTEIN, J., 1985). A árvore NJ foi obtida usando o algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) (NEI, M.; KUMAR, S., 2000) com nível de pesquisa 1 em que as árvores iniciais foram obtidas pela adição aleatória de sequências (500 repetições). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos calculados usando o método de *average pathway* (NEI, M.; KUMAR, S., 2000) e estão nas unidades do número de mudanças ao longo de toda a sequência. A análise envolveu 77 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1<sup>a</sup> + 2<sup>a</sup> + 3<sup>a</sup> + não codificantes. Todas as posições com menos de 50% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 50% de lacunas de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas eram permitidas em qualquer posição. Havia um total de 840 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7 (KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K., 2016).

Ambas as árvores filogenéticas (ITS e COXII) mostraram resultados análogos (figuras 5.1 e 5.2). Usando as ITS, as 14 sequências provenientes dos isolamentos de *P. insidiosum* de ceratites da Índia foram especificamente colocadas no grupo II (Ásia, Austrália e África) e no grupo IV (Tailândia, Israel). Nenhum destes isolamentos foi colocado nos grupos I e III das Américas. Os isolamentos da Índia no grupo II (Ásia, Austrália e África) – India\_4, India\_8, India\_9, India\_10, India\_11, India\_12, India\_13, India\_14, India\_17 e India\_18) foram colocados com alto suporte de *bootstrap* com isolamentos de Taiwan, Tailândia, Nova Guiné, Austrália e África; entretanto os isolamentos India\_3, India\_15, India\_16 e India\_19 foram colocados no grupo IV com isolamentos de Israel e da Tailândia e Israel. Os grupos I e III foram colocados com as sequências de *P. insidiosum* das Américas em ambos os grupos.

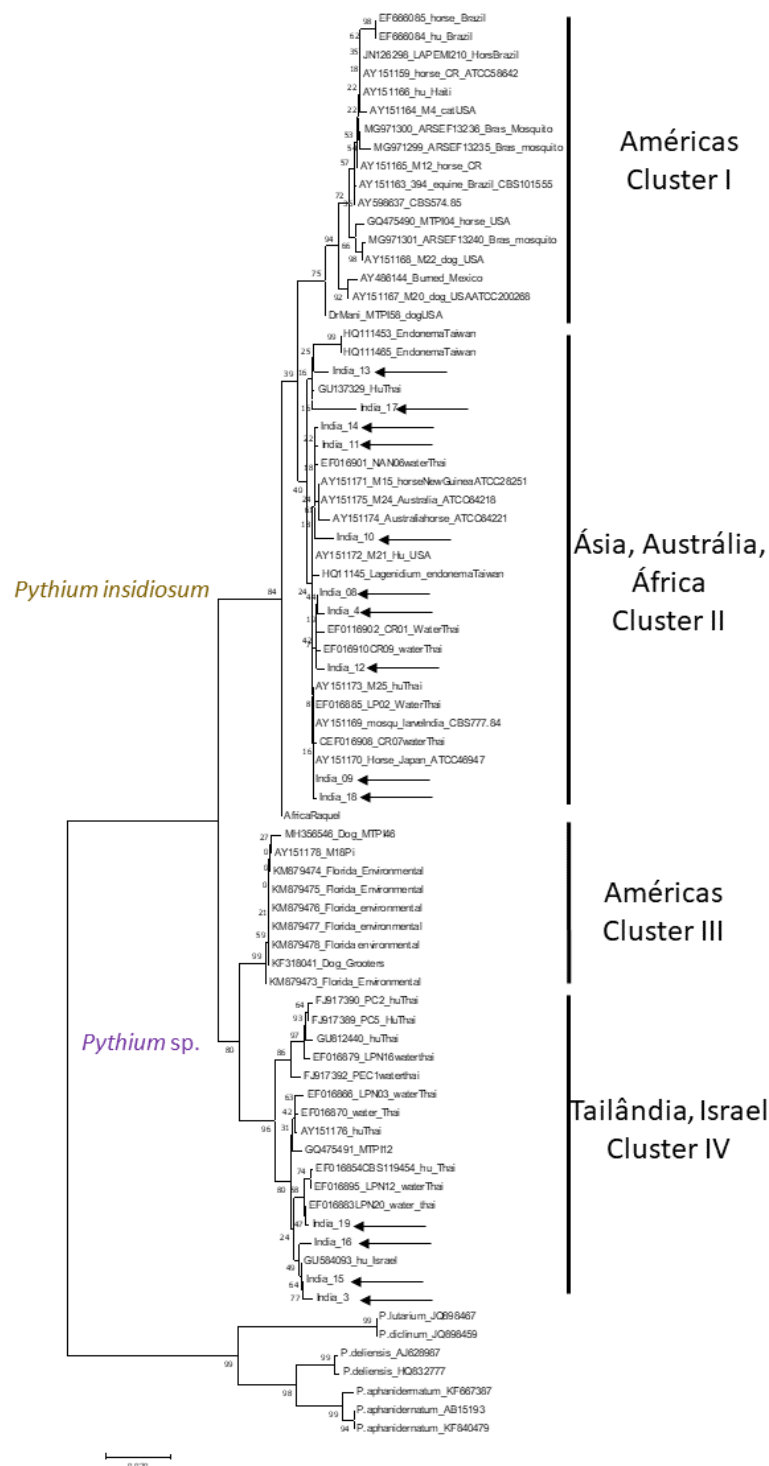


Figura 5.3. Árvore filogenética sequência ITS, método *Neighbor joining*, visão geral. As setas pretas indicam as amostras deste estudo.

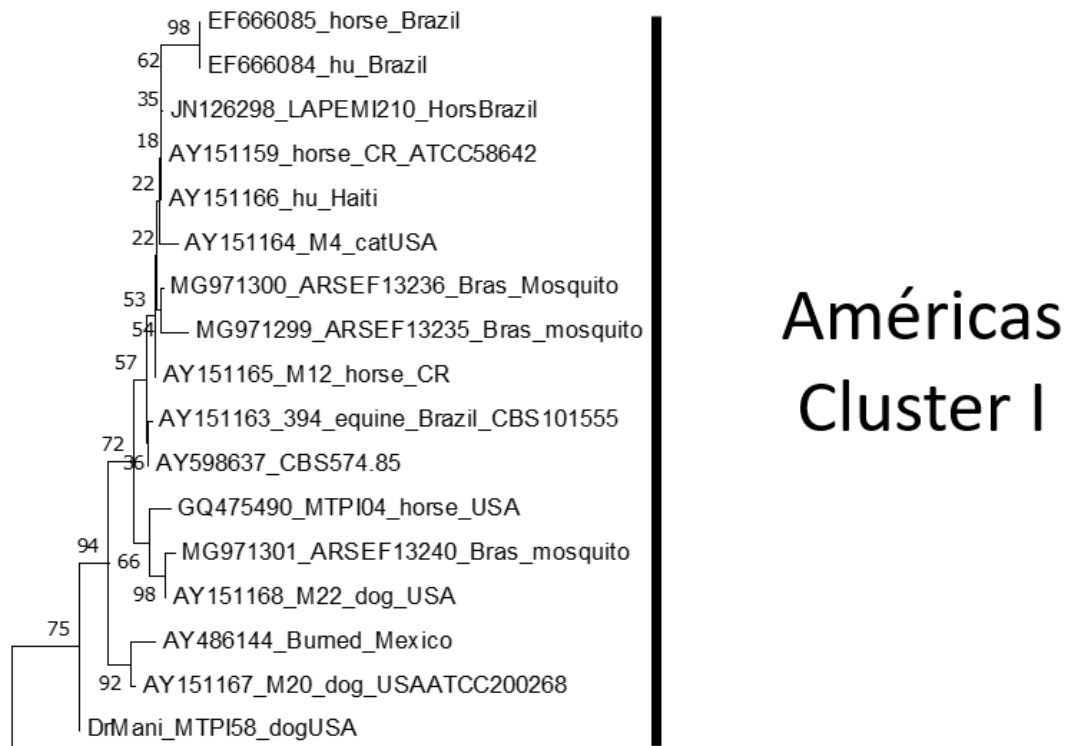


Figura 5.4. Árvore filogenética sequência ITS, método *Neighbor joining*, detalhamento cluster I (Américas).

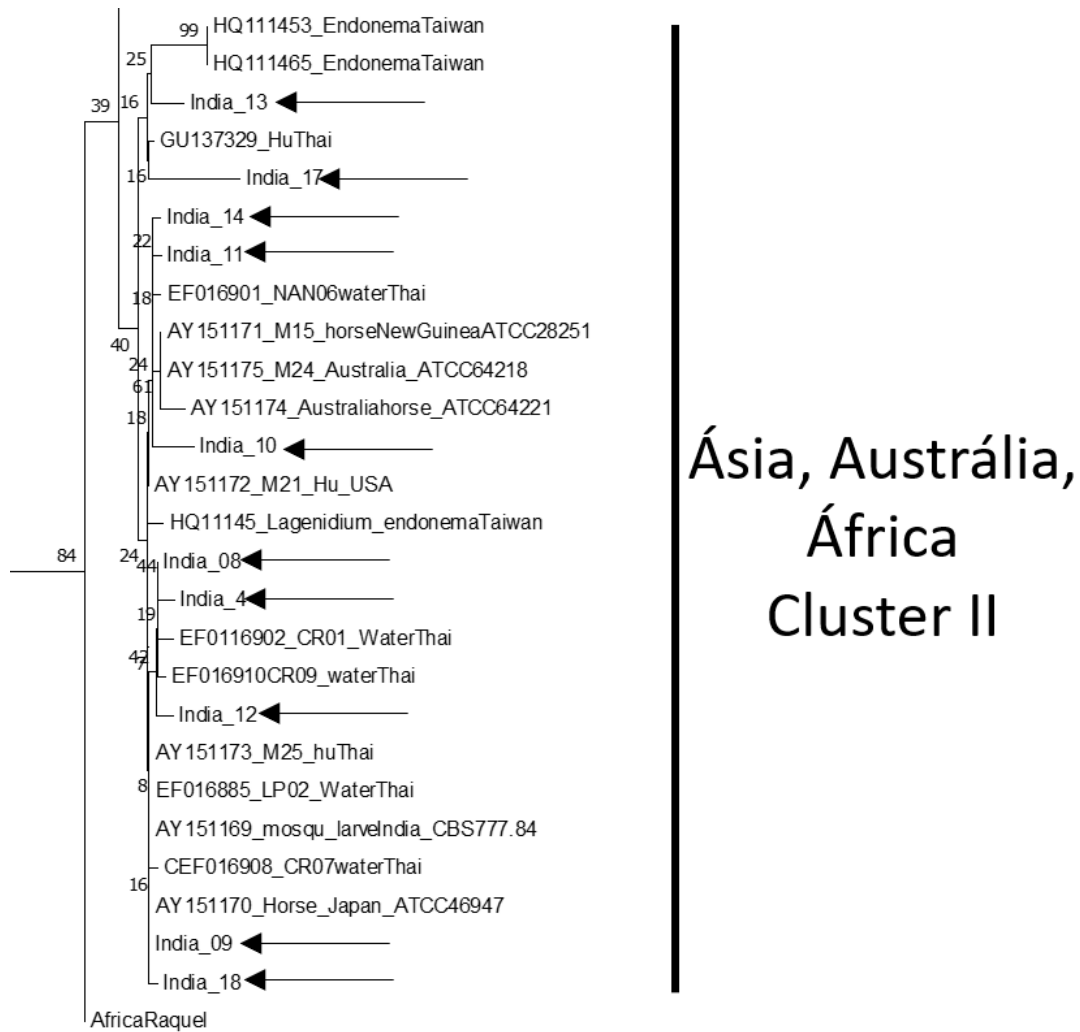


Figura 5.5. Árvore filogenética sequência ITS, método *Neighbor joining*, detalhamento cluster II (Ásia, Austrália e África). As setas pretas indicam as amostras deste estudo.

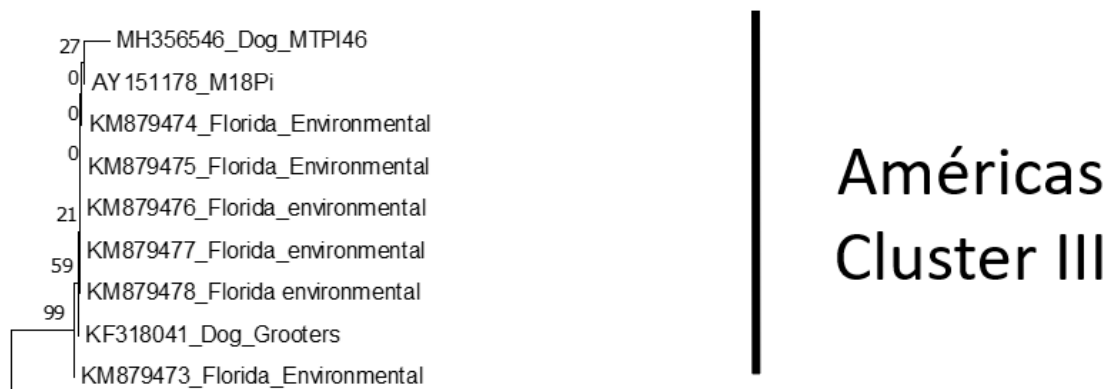


Figura 5.6. Árvore filogenética sequência ITS, método *Neighbor joining*, detalhamento cluster I (Américas).



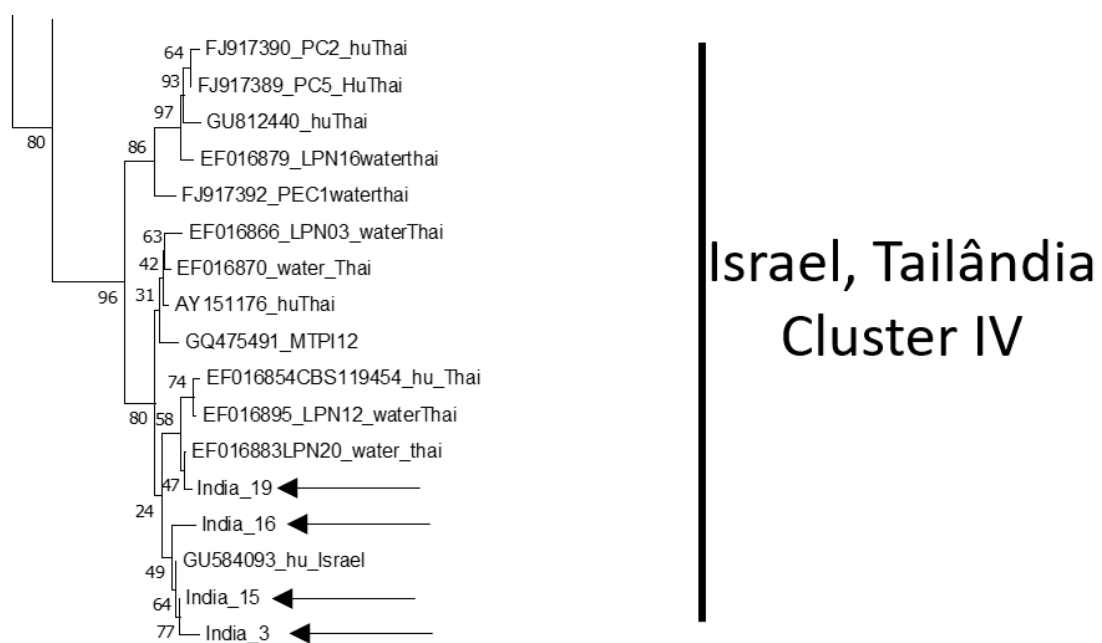


Figura 5.7. Árvore filogenética sequência ITS, método *Neighbor joining*, detalhamento cluster IV (Israel, Tailândia). As setas pretas indicam as amostras deste estudo.

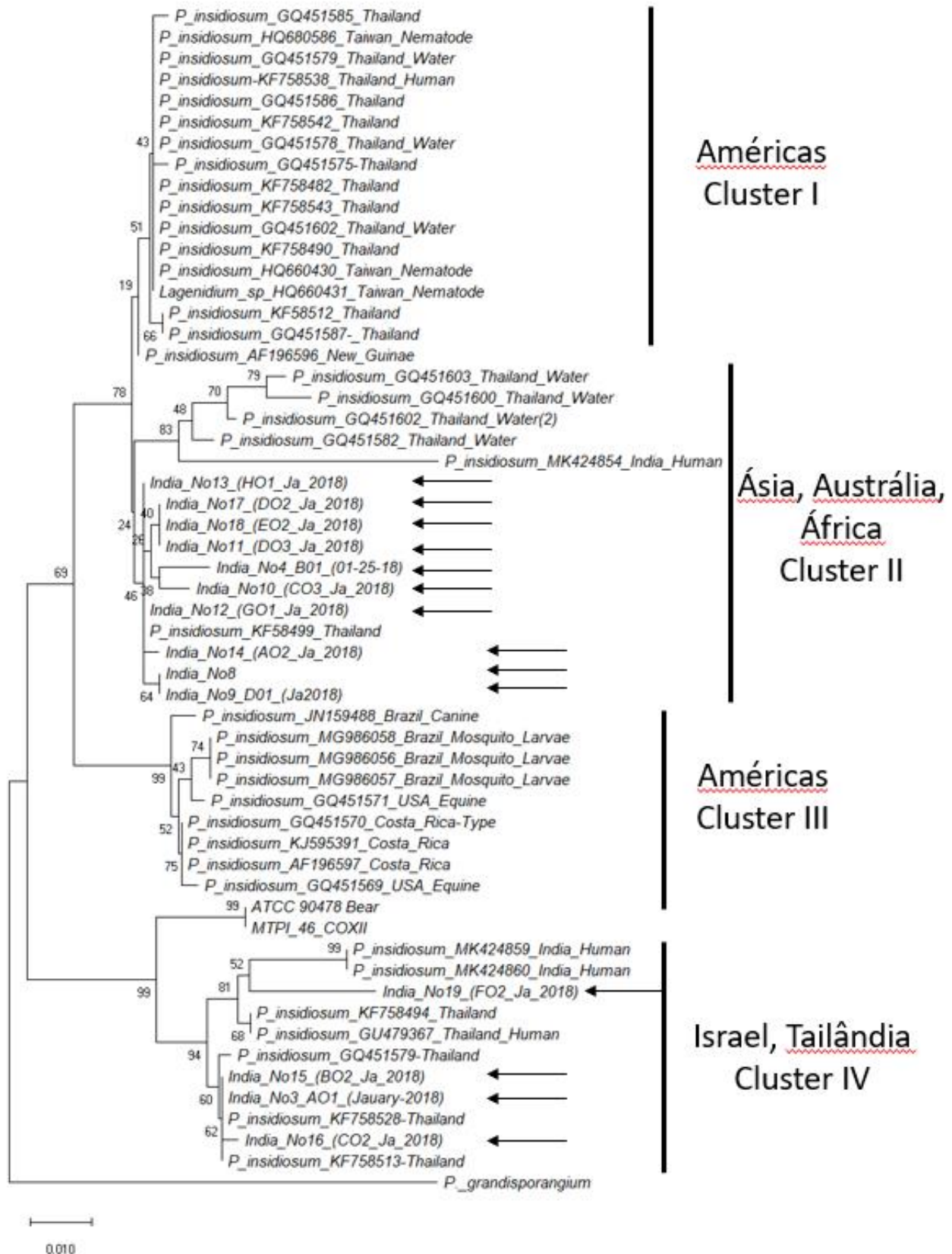


Figura 5.8. Árvore filogenética sequência COXII, método *Neighbor joining*, visão geral. As setas pretas indicam as amostras deste estudo.

## 6. DISCUSSÃO

Observando-se os dados presentes na tabela 5.1 é possível verificar que, em uma análise inicial, não houve discordância das informações referentes aos pacientes fonte dos isolamentos utilizados neste estudo com os dados epidemiológicos descritos na literatura. Muito embora a análise estatística detalhada desses dados não seja objetivo deste trabalho, e apesar de o tamanho da amostra considerada neste estudo ser limitado, apresenta-se a seguir alguns dos dados observados. SANTOS e colaboradores, 1987 e, MENDOZA e AJELLO e McGINNIS, 1996 demonstraram não haver predomínio por sexo, raça ou idade. Pelos dados da Tabela 5.1, é possível observar uma distribuição de frequência de 57,14% de homens e 42,85% de mulheres com idades variando de 18 a 46 anos. Diversos autores (IMWIDTHAYA, 1994; MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2014; MENDOZA e AJELLO e McGINNIS, 1996; TABOSA *et al.*, 2004; CAMUS e GROOTERS e AQUILAR, 2004; BUERGEL e POWE e WHITE, 2006; BERRYESSA *et al.*, 2008; GRECCO *et al.*, 2009; CHAFFIN e SCHUMACHER e MCMULLAN, 1995; RATHI *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019; RATHI *et al.*, 2018; HUNG e LEDDIN, 2014; HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015) sugerem que o contato com água seja o principal fator de risco. Pelos dados enviados referentes aos pacientes fonte das amostras doadas para este estudo, verifica-se que a totalidade dos casos são provenientes de indivíduos que estiveram em contato prévio com coleções hídricas. Em relação à ocupação laboral dos pacientes cujas amostras foram utilizadas neste estudo, pode-se verificar uma frequência de 50% de trabalhadores de regiões agrícolas, indo ao encontro do que foi relatado por LELIEVRE *et al.*, 2015 e RATHI *et al.*, 2018.

O padrão de crescimento encontrado nos cultivos das amostras realizados neste estudo está de acordo com o que é descrito na literatura (RATHI *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2016; LELIEVRE *et al.*, 2015). As culturas realizadas em ágar Sabouraud (a partir do material doado) no BLD na MSU exibiram padrões de crescimento com presença de micélios submersos aderidos ao ágar, característica úmida de coloração branca-amarelada com margens filiformes e

aspecto cremoso, típicos de culturas de *Pythium sp* para todas as amostras cultivadas.

Além disso, neste estudo foram realizados os testes de produção de zoósporos em meio aquoso, demonstrando a formação de vesículas contendo zoósporos móveis, típicos do gênero *Pythium*.

Pequenas amostras de cada uma das culturas foram coradas com lactofenol azul e analisados em microscópio óptico. Foi possível observar hifas não septadas ou raramente septadas sem ramificações na maior parte dos casos. Quando estas septações ou ramificações ocorreram, apresentaram-se como ramificações em diversos padrões irregulares. Essas observações eram esperadas, conforme descrito por HE e colaboradores, 2016.

Estudos anteriores classificavam três grupos (*clusters*) isolados de *P. insidiosum* em mamíferos (SCHURKO *et al.*, 2003a, 2003b). No entanto, relatos de PRESSER e GOSS, 2015 e VILELA *et al.*, 2018 de, pelo menos quatro subdivisões de *P. insidiosum* trouxeram informações adicionais. A primeira divisão em três *clusters* era baseada em poucas amostras de DNA de *P. insidiosum*. Com a adição de maior número de amostras de DNA isoladas na Tailândia, Estados Unidos da América e outras regiões geográficas, ficou evidente que o antigo *cluster* III, na realidade é compreendido de outros dois sub-grupos (III e IV) cada um deles, originando de ramificações da Ásia e da América (SUPABANDHU *et al.*, 2008; PRESSER, J. W.; GOSS, E. M., 2015). Análises filogenéticas posteriores das amostras cadastradas no *GenBank* comprovam que existem pelo menos quatro divisões de *P. insidiosum* isolados de mamíferos. Curiosamente, uma amostra de DNA de *P. insidiosum* isolado de um cão no Wisconsin, nos Estados Unidos da América (KF318041) localizado no sub-grupo III reagiu negativamente no PCR ao se utilizar *primers* específicos para *P. insidiosum* e demonstrou baixos títulos no ELISA com amostra sérica do cão (OLDENHOFF *et al.*, 2014). Esses achados, juntamente com as novas amostras de DNA cadastradas (KITICHOTIRAT *et al.*, 2017) e MALDI-TOF (MANI *et al.*, 2019) sugerem que os isolados de *P. insidiosum* dos grupos III e IV possuem características moleculares e bioquímicas particulares e características antigênicas (MENDOZA e NEWTON, 2005) não encontradas nos membros dos grupos I e II.

Ao analisar a árvore filogenética e determinar a posição de cada amostra avaliada nesse estudo é possível identificar que aquelas nomeadas como India\_4, India\_8, India\_9, India\_10, India\_11, India\_12, India\_13, India\_14, India\_17 e India\_18 possuem características genéticas correspondentes ao patógeno *Pythium insidiosum*. Pertencem ao *cluster* II (Ásia, Austrália e África). No entanto, ao se avaliar as amostras denominadas India\_3, India\_15, India\_16, India\_19 não houve correspondência genética com o patógeno *Pythium insidiosum*. Esses achados baseados nos dados genômicos existentes no Genbank sugerem que os isolamentos de *P. insidiosum*, presentes nos *clusters* III e IV possuem estrutura molecular única e características antigênicas não encontradas nos *clusters* I e II. Com base neste achado filogenético, é possível postular a existência de uma espécie nova dentro do complexo *P. insidiosum*.

Os dados apresentados neste estudo permitem endossar a existência de mais de uma espécie dentro do grupo que hoje conhecemos como *P. Insidiosum*. Na literatura, VILELA e colaboradores, 2019; SCHURKO e colaboradores, 2003a, 2003b; KITTICHOTIRAT e colaboradores, 2017; TANHEHCO e colaboradores, 2011; SUPABANDHU e FISCHER e VANITTANAKOM, 2008; PRESSER e GOSS, 2015 já haviam sugerido a existência de novas espécies nos microrganismos *P. insidiosum* incluídos filogeneticamente nos grupos III e IV.

São necessários novos estudos baseados em análises estatísticas para comprovar a existência dessas novas espécies. No entanto, as evidências encontradas são de extrema relevância científica e o presente estudo abre grande leque de possibilidades na identificação de uma nova espécie, ainda não descrita.

Para futuras análises estatísticas, a fim de comprovar a existência da nova espécie sugerida, poderão ser utilizadas outras metodologias, como *softwares* conhecidos como *TASSEL* (*Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage*), (*Dendrochronology Program Library in R* (dplR) para realização de cruzamento de dados, DnaSP, *multilocus genotype data*, STRUCTURE (BRADBURY *et al.*, 2007; TEAM, R. C., 2020; LIBRADO e ROZAS, 2009; PRITCHARD e STEPHENS e DONNELLY, 2000; EVANNO e REGNAUT e GOUDET, 2005) será necessário para a validação dos dados filogenéticos neste e em outros

estudos (VILELA *et al.*, 2019; PRESSER e GOSS, 2015).

A associação de análises que exploram a diversidade natural de um mapa genômico em altas resoluções apresentam grande importância nas avaliações aprofundadas de estudos do DNA. O *Software TASSEL (Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage* ou, em tradução livre, Análise de traço por associação, evolução e ligação, implementa a abordagem dos modelos linear geral e linear misto para controle populacional e estrutural familiar. Para interpretação dos resultados, o programa permite o cálculo de ligações estatísticas desequilibradas e sua visualização gráfica. A navegação na base de dados e a importação de dados são facilitadas por um *middleware* integrado. Outros recursos incluem a análise de inserções / exclusões, cálculo de estatísticas de diversidade, integração de dados fenotípicos e genotípicos, imputação de dados faltantes e cálculo de componentes principais. Disponibilidade: O executável *TASSEL*, manual do usuário, dados de exemplo conjuntos e documento tutorial estão disponíveis gratuitamente em <http://www.maizegenetics.net/tassel>. O código-fonte do *TASSEL* pode ser encontrado em <http://sourceforge.net/projects/tassel> (BRADBURY, P. J. *et al.*, 2007).

O DnaSP v5 (*DNA Sequence Polymorphism*) é um pacote de *software* para análise abrangente de dados de polimorfismo de DNA. A versão 5 implementa novos recursos e métodos analíticos permitindo análises extensas de polimorfismo de DNA em grandes conjuntos de dados. Entre outros recursos, os métodos recém-implementados permitem: análises em vários arquivos de dados; faseamento de haplótipos; análises de inserção / exclusão de dados de polimorfismo; visualização de resultados através de janelas deslizantes integradas com anotações de genoma disponíveis.

O *multilocus genotype data*, ou, em tradução livre, dados de genotipagem em multilocus é um método de avaliação do genótipo multilocus e classificação detalhada na árvore filogenética. O *software* está disponível em <http://www.stats.ox.ac.uk/zpritch/home.html>.

A metodologia envolve o cálculo de métodos baseados na distância e baseados em modelos. Os métodos baseados na distância procedem calculando

uma matriz de distância de pares, cujas entradas fornecem adequadamente a posição entre cada par de indivíduos. Esta matriz pode então ser representada usando representação gráfica conveniente (como uma árvore ou um gráfico de escala multidimensional) e os *clusters* podem ser identificados a olho nu. Já os métodos baseados em modelos prosseguem assumindo que as observações de cada cluster são desenhos aleatórios de algum modelo paramétrico. A inferência para os parâmetros correspondentes a cada *cluster* é, então, feita em conjunto com a inferência para a associação do cluster de cada indivíduo, usando métodos estatísticos padrão (por exemplo, métodos de máxima verossimilhança ou Bayesianos). Os métodos baseados na distância são geralmente fáceis de aplicar e são frequentemente visualmente atraentes. Na literatura genética, tem sido comum adaptar com o método baseado na distância como *Neighbor Joining* ao agrupamento por genotipagem multilocus (PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, P.; DONNELLY, P., 2000).

O *software Structure* é uma ferramenta que conta com a utilização do algoritmo Bayesiano para identificação de grupos de indivíduos geneticamente semelhantes. No entanto, a capacidade deste algoritmo de detectar o verdadeiro número de clusters ( $K$ ) em uma amostra de indivíduos é limitada quando os padrões de dispersão entre as populações não são muito acurados. Como solução, é possível utilizar uma estatística ad hoc  $K$  com base na taxa de mudança na probabilidade de log de dados entre valores  $K$  sucessivos, para que o *STRUCTURE* detecte com precisão o nível hierárquico superior. Esses resultados são sensíveis ao tipo de marcador usado (AFLP vs. microssatélite), o número de loci marcados, o número de amostras de populações e o número de indivíduos digitados em cada amostra.

## 7. CONCLUSÃO

A pitiose ocular, em particular na forma de ceratite, é uma infecção que mimetiza o acometimento por fungos e, portanto, deve ser uma hipótese considerada em casos de ceratites graves com baixa ou nenhuma resposta aos tratamentos convencionais. Quadros de úlcera de córnea infecciosa grave com aspecto morfológico e biomicroscópico sugestivos de infecção fúngica, mas que, diferentemente do esperado apresentem rápida evolução, também devem levantar a suspeita de possível doença por *P. insidiosum*. Outras características relevantes que podem ser levadas em consideração para esta hipótese são: cultivos de material obtido em amostras clínicas que demonstrem padrão de crescimento submerso, com presença de micélios aderidos ao ágar, presença de zoósporos biflagelados na esporulação e história de contato com ambientes aquáticos. Devido à grande semelhança entre as apresentações clínicas das doenças causadas pelo agente *P. insidiosum* e as de origem fúngica, acredita-se que as primeiras possam ser subdiagnosticadas. Especialmente em países ou regiões em que o microrganismo *P. insidiosum* já foi amplamente demonstrado na literatura como agente etiológico de doenças em animais, parece razoável supor que ele também possa ser o responsável por parte das ceratites que acometem habitantes dessas regiões. É de suma importância que seja estudado mais amplamente para que os diagnósticos sejam realizados de maneira mais assertiva.

O diagnóstico final dessa afecção só pode ser determinado através da utilização de ferramentas moleculares a partir da extração do DNA dos isolamentos, realização de PCR e análise filogenética, com a finalidade de determinar as semelhanças filogenéticas entre os microrganismos encontrados e aqueles já cadastrados na base dados do *GenBank*. Para realização dessa metodologia são utilizados *primers* ITS1, ITS2, 5,8 S rRna, exo-1,3- $\beta$ -Glucanase e COXII.

No presente estudo, ao se realizar a análise de amostras de ceratite doadas da Índia através da metodologia de biologia molecular foi possível confirmar a etiologia da doença como sendo, em sua maioria, *P. insidiosum* (total



de dez amostras localizadas no grupo II). No entanto, quatro dessas amostras foram classificadas no grupo IV. Os microrganismos classificados nos grupos III e IV possuem características moleculares específicas e comportamento antigênico distintos dos agentes classificados nos grupos I e II. Dessa forma, é possível supor que estamos diante de uma nova espécie, localizada no grupo atualmente conhecido como *P. insidiosum*, conforme já haviam sugerido outros autores. Novas avaliações estatísticas são necessárias para comprovar a existência dessa nova espécie possivelmente identificada.

## 8. REFERÊNCIAS

ADL, S. M. *et al.* The revised classification of eukaryotes. **J Eukaryot. Microbiol.**, v. 59, p. 429-514, 2012.

AGARWAL, S. *et al.* Clinical profile of *Pythium* keratitis: perioperative measures to reduce risk of recurrence. **Br J Ophthalmol.**, v.102, n. 2 p.153–157, 2018.

AGARWAL, S. *et al.* Role of Topical Ethanol in the Treatment of *Pythium insidiosum* Keratitis- A Proof of Concept. **Cornea**, v. 39, n. 9, p.1102-1107, 2020.

AGARWAL, S. *et al.* Clinical profile, risk factors and outcome of medical, surgical and adjunct interventions in patients with *Pythium insidiosum* keratitis. **Br J Ophthalmol.**, v. 103, p. 296-300, 2019.

BAULDAUF, S. *et al.* A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290, 972-977. *Science*, v. 290. 972-7, 2000.

BERRYESSA, N. *et al.* Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **J Vet Internal Med.**, v. 22, p. 1065-1069, 2008.

BRADBURY, P. J. *et al.* Software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2633-2635, 2007.

BUERGELT, C.; POWE, J.; WHITE, T. Abdominal Pythiosis in a Bengal Tiger (*Panthera tigris tigris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine.**, v. 37, n. 2, p. 186-189, 2006.

CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **J Vet Diag Invest.**, v. 16, n. 6, p. 567-571, 2004.

CHAIPRASERT, A. *et al.* *Pythium insidiosum* Thai isolates: molecular

phylogenetic analysis. **Asian Biomedicine**, v. 3, n. 6, p. 623-633, 2009.

EVANNO, G.; REGNAUT S.; GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol. Ecol.**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method **The American Naturalist**, v.125, n.1, 1985.

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

GARGAS, A.; DEPRIEST P. T. A nomenclature for fungal PCR primers with example from intron-containing SSU rDNA. **Mycologia**, v. 88, p. 745-748, 1996.

GRECCO, F. B. *et al.* Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n.11, 2009.

GURNANI, B. *et al.* Successful management of pediatric *Pythium insidiosum* keratitis with cyanoacrylate glue, linezolid, and azithromycin: Rare case report. **Eur J Ophthalmol.**, 28 Mar, 2021. Online ahead of print.

HASIKA, R. *et al.* *Pythium* keratitis in South India: Incidence, clinical profile, management, and treatment recommendation. **Indian J Ophthalmol.**, v. 67, n. 1, p. 42-47, 2019.

HE, H. *et al.* Diagnosis and Treatment of *Pythium insidiosum* Corneal Ulcer in a Chinese Child: A Case Report and Literature Review. **Am J Case Rep.**, v. 17, p. 982-988, 2016.

HERR, R. *et al.* Phylogenetic Analysis of *Rhinosporidium seeberi*'s 18S Small-Subunit Ribosomal DNA Groups This Pathogen among Members of the Protoctista mesomycetozoa Clade. **J Clin Microbiol.**, v. 37, n. 9, p. 2750-2754, 1999.

HUNG, C.; LEDDIN, D. Keratitis Caused by *Pythium insidiosum* in an Immunosuppressed Patient with Crohn's Disease. **Clin Gastroenterol Hepatol.**, v. 12, n. 10, 2014.

IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgrad Med J.**, v. 70, p. 558-560, 1994.

JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 11 ed., v. 2: ASM Press, 2015.

KITTICHOTIRAT, W. *et al.* Draft genome and sequence variant data of the oomycete *Pythium insidiosum* strain Pi45 from phylogenetically-distinct Clade-III. **Data Brief**, v. 15, p. 896–900, 2017.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol.**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LANTERNIER, F. *et al.* Case Report: Imported *Pythium insidiosum* Keratitis After a Swim in Thailand by a Contact Lens-Wearing Traveler. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 92, n. 2, p. 270–273, 2015.

LELIEVRE, L. *et al.* Case Report: Imported *Pythium insidiosum* Keratitis After a Swim in Thailand by a Contact Lens-Wearing Traveler. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 92, n. 2, p. 270–273, 2015.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

MANI R, *et al.*, Identification of *Pythium insidiosum* complex by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Med Microbiol** v. 68 p. 574-584, 2019.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. *et al.* Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, n. 3, p. 205-210, 2014.

MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*. In: MERZ, W.G., HAY, R.J. (eds). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10<sup>a</sup> ed. Oxford: Medical Mycology, p. 617-630. 2005.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J Mycol Med.**, v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **J Clin Microbiol.**, v. 31, n. 11, p. 2967-2973, 1993.

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

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

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

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

OLDENHOFF, W. *et al.* Cutaneous pythiosis in two dogs from Wisconsin, USA. **Vet. Dermatol.**, v. 25, p. 52–54, 2014.

PATEL, N. N. *et al.* Identification of An Emerging Pathogen *Pythium Insidiosum* From A Case of Onychomycosis. **GCSMC Journal of Medical Sciences**, v. 1, n. II, 2012.

PRESSER, J. W.; GOSS, E. M. Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. **Med. Mycol.**, v. 53, p. 674–683, 2015.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, P.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 15, p. 945-959, 2000.

RATHI, A. *et al.* *Pythium* Keratitis Leading to Fatal Cavernous Sinus Thrombophlebitis. **Cornea**, v. 37, n. 4, p. 519-522, 2018.

RIBEIRO, T. C. *et al.* Microevolutionary analyses of *Pythium insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based on exo-1,3- $\beta$ -glucanase gene. **Infect Genet Evol.**, v. 48, p. 58-63, 2017.

ROMERO, I. L. *et al.* Antibacterial properties of cyanoacrylate tissue adhesive: does the polymerization reaction play a role? **Indian J Ophthalmol.**, v. 57, n. 5, p. 341–344, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 2001.

SATHAPATAYAVONGS, B. *et al.* Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. **J Infect Dis**, v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.

SCHURKO, A. M. *et al.* A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycol. Res.**, v. 107, p. 537–544, 2003b.

SCHURKO, A. M. *et al.* Evidence for geographic clusters: molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia**, v. 95, p. 200–208, 2003a.

SUPABANDHU, J.; FISCHER, M. C.; VANITTANAKOM, N. Polymorphic microsatellite markers for the human oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Molecular Ecology Notes**, V. 7, N. 6, P. 1088-1090, 2007.

SUPABANDHU, J. *et al.* Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Med Mycol.**, v. 46, n.1, p. 41-52, 2008.

TABOSA, I. M. *et al.* Outbreaks of Pythiosis in Two Flocks of Sheep in Northeastern Brazil. **Veterinary Pathology.**, v. 41, n. 4, p. 412-415, 2004.

TANHEHCO, T. Y. *et al.* *Pythium insidiosum* keratitis in Israel. **Eye Contact Lens.**, v. 37, n. 2, p. 96-8, 2011.

TEAM, R. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R. Foundation for Statistical Computing. Viena, Áustria: R. Foundation for Statistical Computing, 2020.

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

VILELA, R. *et al.* *Pythium insidiosum* isolated from infected mosquito larvae in central Brazil. **Acta Tropica**, v. 185, p. 344-348, 2018.

VILELA, R.; VISWANATHAN, P.; MENDOZA, L. A biochemical screening approach to putatively differentiate mammalian pathogenic Oomycota species in the clinical laboratory. **J. Med. Microbiol.**, v. 64, p. 862–868, 2015.