

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia



Dissertação

**Avaliação da presença de *Pythium insidiosum* em imaturos e adultos de
*Culex quinquefasciatus***

Caroline Quintana Braga

Pelotas, 2020

CAROLINE QUINTANA BRAGA

**Avaliação da presença de *Pythium insidiosum* em imaturos e adultos de
*Culex quinquefasciatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr^a Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B813a Braga, Caroline Quintana

Avaliação da presença de *Pythium insidiosum* em imaturos e adultos de *Culex quinquefasciatus* / Caroline Quintana Braga ; Daniela Isabel Brayer Pereira, orientadora. — Pelotas, 2020.

51 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Oomiceto. 2. Culicídeos. 3. Larvas. 4. Imaturos. 5. Adultos. I. Pereira, Daniela Isabel Brayer, orient. II. Título.

CDD : 595.775

Caroline Quintana Braga

Avaliação da presença de *Pythium insidiosum* em imaturos e adultos de *Culex quinquefasciatus*

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 03/03/2020

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Daniela Isabel Brayer Pereira (Orientadora). Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Daiane Drawanz Hartwig. Doutora em Biotecnologia e Pós-Doutorado na Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Marcial Corrêa Cárcamo. Doutor em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

M.V. Dr^a. Cristina Gomes Zambrano. Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a Dr^a Camila Belmonte Oliveira. Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria (suplente)

AGRADECIMENTOS

A minha avó Neiva Maria Braga (*in memorian*) por todo apoio, incentivo, carinho, amizade e por sempre ter acreditado em mim. Seus ensinamentos jamais serão esquecidos e à senhora dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas.

Aos meus pais Carlos Alberto Braga e Ivoneti Q. Braga pela educação, amor, incentivo, carinho e estarem sempre presentes na minha vida.

Ao meu irmão Mateus Q. Braga por todas as alegrias, amizade, conversas.

A minha querida avó Ainda Sedeni Lemos Quintana pelo carinho.

Ao meu namorado Juliano Cunha por todo apoio, por me ensinar a acreditar no meu potencial e nunca desistir diante das dificuldades.

A minha orientadora professora Dr^a Daniela Brayer Pereira, que me aceitou como estagiária sete anos atrás; por ter me ensinado desde os primeiros passos na iniciação científica até aqui. Por ter me corrigido quando necessário, por lutar por meu crescimento profissional, pelo incentivo e dedicação.

As professoras Dr^a. Sônia A. Botton, Dr^a. Daiane D. Hartwig, Dr^a Élvia S. Vianna, por aceitarem participar da minha comissão de orientação, por dedicarem seu tempo para me ajudar, por todo o ensinamento e considerações importantes na minha pesquisa.

A Professora Dr^a Élvia por todos os ensinamentos e por se colocar à minha disposição no aprendizado sobre o mundo fantástico dos mosquitos.

A colega de mestrado Carolina Bermann pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa, pela amizade, pela parceria, pelo chimarrão e pelas caronas.

A colega de mestrado bióloga Angelita Milech, por toda a dedicação e por não medir esforços em me ajudar na árdua tarefa que é cuidar e manter uma colônia viável de mosquitos, para a realização dos testes. Por toda a amizade e companheirismo.

Ao colega Andrios Moreira pela maravilhosa carona diária, pela amizade e por toda a ajuda.

Ao colega de mestrado Pedro Rassier pela amizade, por todas as aulas, trabalhos que realizamos. Pelas conversas, chimarrão e companheirismo durante a graduação e mestrado.

Ao nosso grupo de pesquisa, Carolina Brasil, Cristiane Baptista, Júlia Valente e Waldenis Trindade pela colaboração nas tarefas diárias, pela amizade, incentivo e toda ajuda nos projeto. O trabalho em equipe é muito importante.

As Colegas Carla Weiblen, Lara Ianiski e Paula Stibbe da UFSM, por toda a atenção, paciência, ensinamentos e amizade.

À outros amigos, colegas, professores e pessoas queridas que não denominei, mas tem meu profundo agradecimento.

À Universidade Federal de Pelotas por toda a minha formação acadêmica desde a graduação até a pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia e todos os professores integrantes que contribuíram com o conhecimento científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

Resumo

BRAGA, Caroline Quintana. **Avaliação da presença de *Pythium insidiosum* em imaturos e adultos de *Culex quinquefasciatus***. 2020. 51f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pythium insidiosum é um oomiceto que causa a pitiose, uma infecção que acomete diferentes espécies de mamíferos, incluindo os humanos. Habita ecossistemas pantanosos de regiões com clima tropical, subtropical e temperado do mundo. O presente estudo avaliou a capacidade de *P. insidiosum* infectar imaturos e adultos de *C. quinquefasciatus*. Imaturos de *C. quinquefasciatus* foram expostos aos zoósporos (8×10^3 zoósporos/mL) do oomiceto durante 24 horas. Adicionalmente, a infecção desde o estágio de L1 até adultos também foi avaliada. A detecção de *P. insidiosum* foi realizada através de cultivo microbiológico em agar bendazol e pentaclorobenzeno, PCR e análise histopatológica. Um total de 2400 larvas em estágio L1 e L2 (48 *pools* de 50 larvas); 2400 larvas em estágio L3 e L4 (48 *pools* de 50 larvas); 1200 pupas (24 *pools* de 50 pupas) e 500 ovos (10 *pools* de 50 ovos) foram avaliados na análise microbiológica. Evidenciou-se que todos os estágios larvais foram infectados com zoósporos de *P. insidiosum*. Na análise molecular das formas imaturas e adultas a presença de DNA de *P. insidiosum* foi detectada apenas nos *pools* dos estágios larvais L3 e L4. Em ovos, pupas e adultos não foi possível detectar-se a presença do oomiceto. Na histologia das larvas L4 infectadas com *P. insidiosum* foram observadas em H&E, estruturas negativas, sugestivas do oomiceto. Adicionalmente, no Grocott foram observadas estruturas tubuliformes largas e impregnadas pela prata condizentes com hifas de *P. insidiosum*. Os resultados sugerem que o oomiceto pode utilizar as larvas desse hospedeiro invertebrado para manutenção de seu ciclo de vida nos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: oomiceto, culicídeos, larvas, imaturos, adultos.

Abstract

BRAGA, Caroline Quintana. **Avaliação da presença de *Pythium insidiosum* em imaturos e adultos de *Culex quinquefasciatus***. 2020. 51f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia)- Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pythium insidiosum is an oomycete that causes pythiosis, an infection that affects different species of mammals, including humans. It inhabits swampy ecosystems in regions with tropical, subtropical and temperate climates in the world. The presence of this microorganism has been described in culicid larvae such as *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. The present study evaluated the ability of *P. insidiosum* to infect immature and adults of *C. quinquefasciatus*. Immatures (egg, L1, L2, L3, L4 and pupa) of *C. quinquefasciatus* were exposed to the zoospores (8×10^3 zoospores / mL) of the oomycete for 24 hours. In addition, infection from the L1 stage to adults was also assessed. The detection of *P. insidiosum* was carried out through microbiological culture on Bendazol and Pentachlor agar, PCR and histopathological analysis. A total of 2400 larvae in stage L1 and L2 (48 pools of 50 larvae); 2400 larvae in stages L3 and L4 (48 pools of 50 larvae); 1200 pupae (24 pools of 50 pupae) and 500 eggs (10 pools of 50 eggs) were evaluated in the microbiological analysis. It was shown that all larval stages were infected with *P. insidiosum* zoospores. In the molecular analysis of immature and adult forms, the presence of *P. insidiosum* DNA was detected only in the pools of larval stages L3 and L4. In eggs, pupae and adults it was not possible to detect the presence of the oomycete. In the histology of L4 larvae infected with *P. insidiosum*, no histological changes were observed in H&E. However, it is possible to observe the presence of negative images suggestive of *P. insidiosum* hyphae. Additionally, in the Grocott, large tubuliform structures were observed, impregnated by silver, consistent with hyphae of *P. insidiosum*. The results suggest that the oomycete can use the larvae of this invertebrate host to maintain its life cycle in aquatic ecosystems; however the culicid does not constitute a vector of this microorganism to vertebrate hosts.

Keywords: oomycete, culicideos, larvae, immature, adults

Lista de Figuras

Figura 1A: Crescimento abundante do micélio de <i>Pythium insidiosum</i> . Cultivo em agar CMA por 72h/37°C	15
Figura 1B: Microscopia de hifas de <i>Pythium insidiosum</i> (400x)	15
Figura 2:Ciclo Biológico de <i>Pythium insidiosum</i>	17
Figura 3A: - Fragmentos de <i>Paspalum notatum</i> infectados por hifas de <i>Pythium insidiosum</i> em meio de indução	18
Figura 3B: Microscopia de <i>Paspalum notatum</i> infectados por hifas de <i>Pythium insidiosum</i>	18
Figura 4A: Fêmea <i>Culex quinquefasciatus</i>	22
Figura 4A: Ciclo Biológico de <i>Culex</i> sp.	23
Figura 6: Ovos em jangada de <i>Culex quinquefasciatus</i>	23
Figura 7A: Larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	24
Figura 7B: Pupas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	24
Manuscrito	
Figura 1: A. Cultivo de <i>P. insidiosum</i> a partir de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> infectadas com zoósporos do oomiceto. Cultura em agar bendazol, incubado a 37°C/48h. B. Microscopia óptica a partir do cultivo obtido das larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> infectadas.....	33
Figura 2: A: Microscopia de larva L4 infectada. H&E (400X). B: Microscopia de larva L4 infectada. Técnica de Grocott (1000X)	34

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. Revisão de literatura	14
3.1 <i>Pythium insidiosum</i> e pitiose	14
3.1.1 <i>Pythium insidiosum</i>	14
3.1.2 Pitiose	18
3.3 <i>Culex quinquefasciatus</i> Say 1823.....	21
4.Manuscrito	26
4.1 Resumo.....	27
4.2 Introdução	28
4.3 Metodologia	30
4.4 Resultados	32
4.5 discussão.....	34
4.6 Conclusão.....	37
4.7 Referências	38
5.Conclusão	42
6. Referências Bibliográficas.....	43

1. Introdução

Pythium insidiosum é o agente causador da pitiose em mamíferos (GAASTRA et al., 2010). É um oomiceto aquático classificado no Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e Espécie *Pythium insidiosum* (ALEXOUPOLOS, 1996).

São micro-organismos termofílicos e ubíquos que habitam ecossistemas aquáticos e terrestres de regiões de clima quente. Enquanto alguns gêneros de oomicetos são sapróbios, outros são patógenos, podendo causar infecções em plantas (*Pythium* e *Phytophthora*), insetos (*Lagenidium* e *Pythium*), peixes (*Achlya*, *Saprolegnia* e *Pythium*) e mamíferos (*Lagenidium* e *Pythium*) (MENDOZA; VILLELA, 2013).

A pitiose é uma doença piogranulomatosa, sendo descrita em vários países (MENDOZA et al., 1996). Em humanos, o maior número de casos é relatado na Tailândia (KRAJAEJUN et al., 2006) e a doença em equinos é endêmica no Brasil, particularmente no Pantanal (MENDOZA et al., 1996; SANTOS et al., 2014) e na região Sul, no estado do Rio Grande do Sul (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; WEIBLEN et al., 2015). Comumente, observam-se que os animais afetados, principalmente equinos, permanecem por longos períodos em contato com águas paradas em lagos, açudes ou banhados (CHAFIN et al., 1995). Também a doença é documentada em outros mamíferos incluindo caninos (PEREIRA et al., 2013), bovinos (GRECCO et al., 2009), ovinos (SANTURIO et al., 2008), entre outros. Este oomiceto está bem adaptado a temperatura corporal de mamíferos, apresentando temperaturas ótimas e máximas de crescimento de 34°C a 36°C e 40°C a 45°C, respectivamente (DE COCK et al., 1987).

P. insidiosum além de estar presente em ambientes aquáticos, como áreas pantanosas e reservatórios de águas (Miller, 1983; Supabandhu et al., 2008; Presser; Goss, 2015; Zambrano et al., 2017), este oomiceto também foi recuperado de larvas de *Culex quinquefasciatus* na Índia (Schurko et al., 2003) e de larvas de *Aedes aegypti* no Estado de Tocantins, região central do Brasil (VILELA et al., 2018). Este fato sugere que este micro-organismo apresenta afinidade por hospedeiros invertebrados, podendo utilizar larvas de mosquitos para completar seu ciclo de vida.

Na pitiose em animais, comumente observa-se que as lesões cutâneas nas espécies afetadas ocorrem em regiões que estão em maior contato com a água (Miller; Campbele, 1982; Chafin et al., 1995; Mendoza et al., 1996), o que é justificado pelo ciclo biológico de *P. insidiosum*. Todavia, os relatos de infecção em animais e humanos sem histórico de contato com ambientes aquáticos, bem como a ocorrência de lesões em regiões do corpo com pouca probabilidade de contato com águas contaminadas (Bissonnette et al., 1991; Wellehan et al., 2004; Pierezan et al., 2009; Santos et al., 2011), induzem a questionamentos a respeito da presença de outras fontes de infecção, incluindo o contato com outros propágulos de *P. insidiosum*, assim como hifas, oósporos, oogônia (Mendoza et al., 1996) e até mesmo a aspiração de zoósporos aerolizados (Camus et al., 2004). Neste contexto, os culicídeos poderiam atuar como uma provável fonte de infecção.

Considerando que as larvas dos culicídeos e *P. insidiosum* compartilham o mesmo nicho ecológico e que este oomiceto já foi isolado de larvas de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* torna-se importante conhecer a participação destes insetos na epidemiologia da pitiose, bem como no ciclo biológico de *P. insidiosum*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Verificar se *Pythium insidiosum* é capaz de infectar as formas imaturas e adultos de *Culex quinquefasciatus*

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar, em condições experimentais controladas, se ovos, pupas, larvas de *C. quinquefasciatus* em diferentes estágios são infectadas com zoósporos de *P. insidiosum*;
- Verificar, em condições experimentais controladas, se larvas expostas ao *P. insidiosum* originam adultos infectados;
- Estudar se a infecção por zoósporos de *P. insidiosum* em larvas de *C. quinquefasciatus* induz alterações histológicas no culicídeo;
- Avaliar se a presença de zoósporo de *P. insidiosum* em condições experimentais controladas, afeta o desenvolvimento, taxa de mortalidade e motilidade das larvas de *C. quinquefasciatus*;

3. Revisão de Literatura

3.1 *Pythium insidiosum* e pitiose

3.1.1 *Pythium insidiosum*

Os oomicetos compreendem um grupo de organismos que se assemelham morfológicamente aos membros do Reino Fungi. No entanto estudos demonstram que as algas são os ancestrais comuns deste grupo de organismos, devido a similaridade bioquímica e a presença de celulose na parede celular (ADHIKARI et al., 2013).

O gênero *Pythium* compreende micro-organismos termofílicos, ubíquos, presentes em ecossistemas de água doce e no solo. Esse gênero inclui mais de 250 espécies descritas, sendo algumas dessas sapróbias e outras patógenas para plantas (*Pythium* e *Phytophthora*), insetos (*Lagenidium* e *Pythium*), peixes (*Achlya*, *Saprolegnia* e *Pythium*) (MENDOZA; VILELA, 2013) e mamíferos (*Lagenidium* e *Pythium*) (ALEXOPOULOS, 1996; GAASTRA et al., 2010; KAGEVAMA, 2014).

Pythium insidiosum é um oomiceto que possui como características: crescimento filamentoso similar aos fungos verdadeiros, reprodução sexuada oogâmica; reprodução assexuada com liberação de zoósporos biflagelados; ausência de ergosterol como principal esteroide de membrana citoplasmática (GROOTERS, 2003) e parede celular composta por traços de celulose e β -glucana, estando a quitina presente em pequena quantidade (HENDRIX, 1964; MOORE-LANDECKER, 1996; ALEXOPOULOS et al., 1996).

Em cultivo em agar farinha de milho (CMA) as colônias de *P. insidiosum* apresentam-se transparentes ou esbranquiçadas, submersas com curto micélio aéreo e padrão radiado (FIGURA 1A). As hifas apresentam-se cenocíticas, com

diâmetro que varia entre 4 e 10 μ m e ramificações perpendiculares laterais em ângulo reto (FIGURA 1B). (DE COCK et al., 1987; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996)

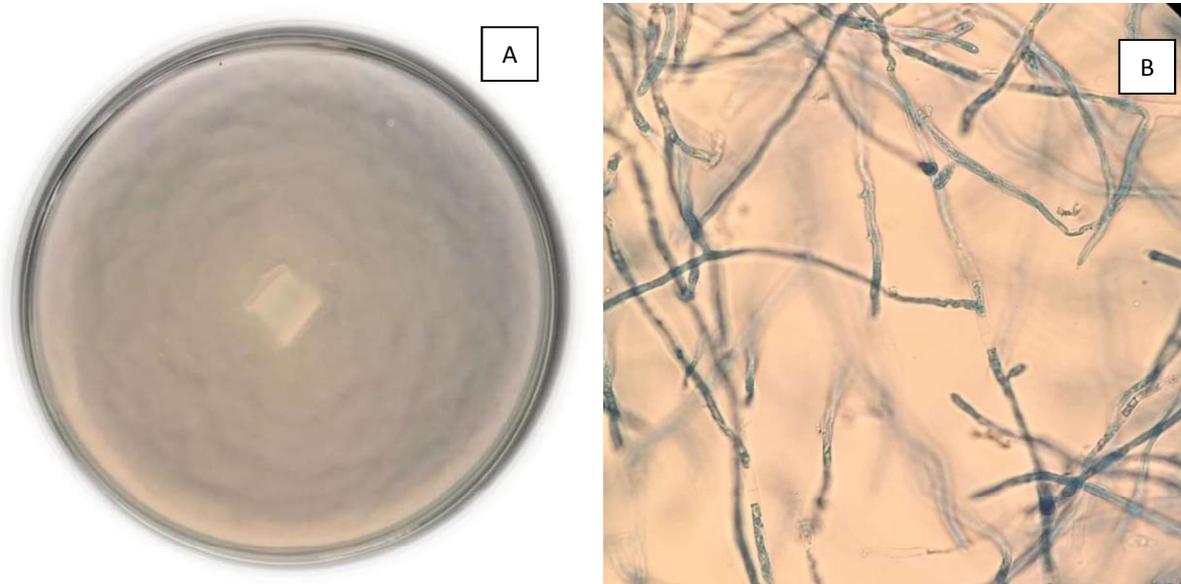


Figura 1A- Crescimento abundante do micélio de *Pythium insidiosum*: a colônia apresenta-se transparente ou esbranquiçada. Cultivo em agar CMA por 72h/37°C; Figura 1B- Microscopia de hifas de *P. insidiosum*, coradas com azul de algodão: as hifas são largas, ramificadas em ângulo reto. (40X). Fonte: Arquivo pessoal

Este oomiceto é capaz de infectar mamíferos, causando uma doença denominada pitiose. A doença e o seu agente etiológico receberam diferentes denominações ao longo dos anos. Na metade do século XIX, pesquisadores denominaram de “bursattee”, uma doença granulomatosa cutânea crônica, em um equino na Índia (GROOTERS, 2003). No final do século XIX, através de dados histopatológicos sua etiologia fúngica foi proposta por Smith (1884) e Drouin (1896) (apud SANTURIO, 2008). Em 1901 pesquisadores holandeses isolaram este patógeno de equinos e o consideraram como um zigomiceto (apud DE COCK et al., 1987). Assim, nomearam a doença de “hyphomycoses destruens”, porém não classificaram o agente etiológico. Somente em 1961, Bridges e Emmons realizaram sua identificação como *Hyphomyces destruens*. Por apresentar semelhanças com as micoses causadas por zigomicetos a enfermidade foi nomeada de ficomicose.

No entanto, em 1974 Austwick e Copland, estudando isolados de equinos da Nova Guiné verificaram que o micro-organismo era capaz de produzir zoósporos biflagelados, assim foi incluído no gênero *Pythium*. Entretanto, De Cock et al. (1987)

ao analisarem isolados de equinos de diferentes regiões geográficas e de caninos dos Estados Unidos, concluíram que todos os isolados anteriores com outras nomenclaturas apresentavam as mesmas características, sendo então classificado como *P. insidiosum*. Posteriormente, Mendoza; Marin (1989), estabeleceram a nomenclatura definitiva do agente da pitiose como *P. insidiosum*, baseados em estudos sorológicos com anti-soros oriundos de coelhos e equinos infectados com *P. insidiosum* e *P. destruens*. Todavia, ao longo dos anos a taxonomia ainda continuou sendo discutida e por fim, o agente etiológico da pitiose foi classificado no reino Stramenipila, filo Oomycota, família *Pythiaceae*, gênero *Pythium* e espécie *P. insidiosum* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Locais com acúmulo de água estagnada como açudes, banhados e áreas pantanosas favorecem a reprodução assexuada de *P. insidiosum* (MILLER E CAMPBELL, 1983; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Neste sentido, a presença de *P. insidiosum* em áreas alagadiças foi previamente demonstrada por Miller (1983) em áreas pantanosas da Austrália; Supabandhu et al. (2008) em reservatórios de água utilizados para irrigação de lavouras na Tailândia; Presser; Goss (2015) nos EUA e por Zambrano et al. (2017) em diferentes ambientes pantanosos no estado brasileiro do Rio Grande do Sul. Nestes ambientes o oomiceto utiliza plantas aquáticas para a formação de micélio e zoosporângios que originam zoósporos biflagelados infectantes que são liberados na água. Estas estruturas movimentam-se até encontrar outra planta e recomeçar seu ciclo biológico.

De acordo com Miller; Campbell (1982) a formação de zoósporos é favorecida em temperaturas ambientais entre 30°C e 40°C. Posteriormente, Zambrano et al. (2017) ao avaliarem a influência de diferentes temperaturas sobre a zoosporogênese *in vitro* de *P. insidiosum* demonstraram que as temperaturas de 20°C e 37°C foram ideais para o processo de zoosporogênese e formação de zoósporos de *P. insidiosum*. Contudo, observaram que as temperaturas de 5°C e 15°C não inviabilizaram o micro-organismo e, inclusive, a 15°C houve a produção de zoósporos infectantes.

A infecção nos mamíferos pode ocorrer quando os animais tem acesso aos ecossistemas aquáticos. Os zoósporos de *P. insidiosum* presentes nesses ambientes podem ser atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados dos animais,

onde se fixam e emitem tubos germinativos dando início a pitiose (MILLER; CAMPBELL 1982; MILLER, 1983). (FIGURA 2).

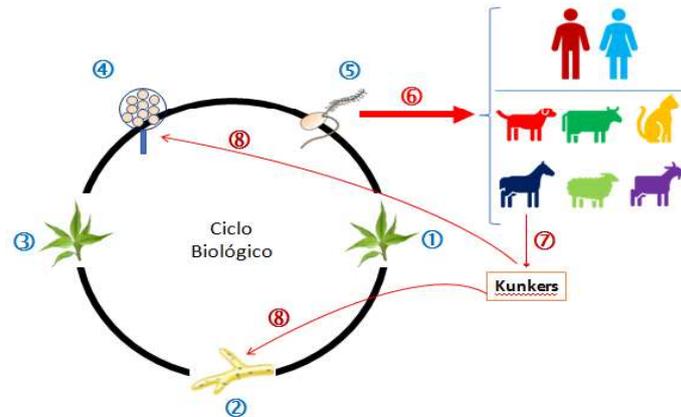


Figura 2- Ciclo Biológico de *Pythium insidiosum*. 1- zoósporos fixam-se em plantas aquáticas; 2- crescimento miceliano na planta hospedeira; 3- reprodução assexuada na planta hospedeira; 4- formação de zoosporângios e liberação de zoósporos; 5- zoósporos livres no ambiente aquático; 6- pitiose em mamíferos: pode ocorrer em hospedeiros suscetíveis em contato com água contendo zoósporos; 7- kunkers (massa necrótica contendo hifas de *P. insidiosum*) podem ser desprendidos das lesões nos equídeos; 8- Kunkers na água.

Fonte: LORETO (2018).

In vitro é possível induzir a reprodução assexuada de *P. insidiosum*. Para isso, colônias do micro-organismo são cultivadas a 37°/96h em agar CMA juntamente com pequenos fragmentos de *Paspalum notatum*, previamente esterilizados. Posteriormente, os fragmentos de grama parasitados com micélio de *P. insidiosum* são transferidos para uma placa de Petri contendo meio de indução (solução rica em sais utilizada para induzir a zoosporogênese) (FIGURA 3A), sendo incubadas a 37°C/3-8horas. Fragmentos de grama são montados entre lâmina e lamínula e a observação de zoosporângios e zoósporos é realizada por microscopia óptica (FIGURA 3B) (MENDOZA; PRENDAS, 1988)

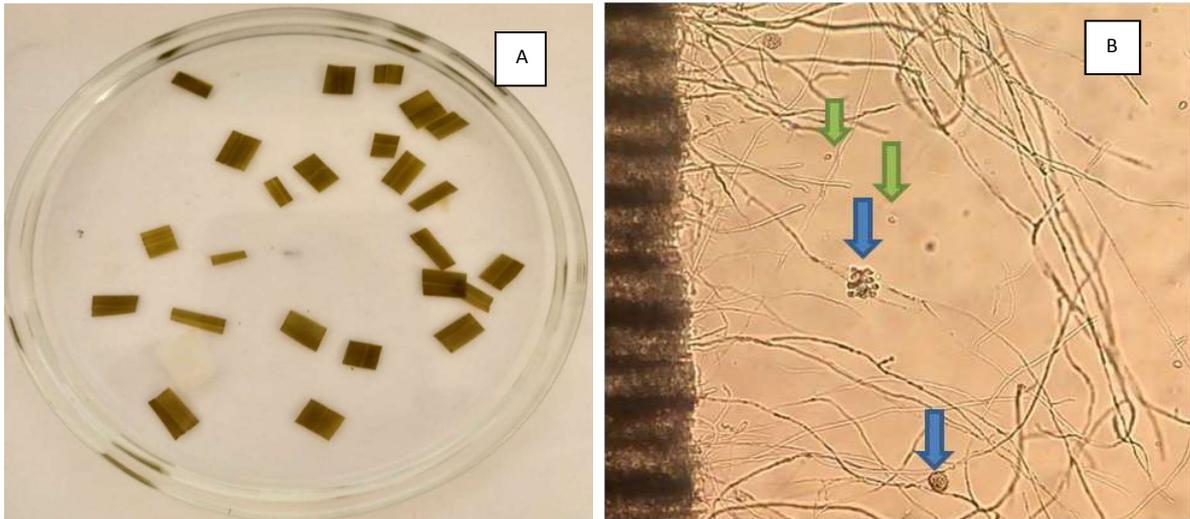


Figura 3A- Fragmentos de *Paspalum notatum* infectados por hifas de *Pythium insidiosum* em meio de indução; Figura 3B- Microscopia optica demonstrando zoosporângios (setas azuis) e zoósporos (setas verdes) de *P. insidiosum*.(400X)

Para a identificação da espécie, além da observação das características macro e micromorfológicas das colônias, zoosporângios e zoósporos, o emprego de técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e o sequenciamento de DNA, torna-se de extrema importância para confirmação da espécie. A identificação molecular preliminar é possível após a extração do DNA total e posterior detecção de *amplicons* obtidos através da técnica de PCR, utilizando *primers* específicos. Contudo, é necessário que os *amplicons* sejam submetidos ao sequenciamento para a confirmação do micro-organismo (VINITTANAKOM et al., 2004).

Grooters; Gee (2002) propuseram um conjunto de *primers* denominados PI1 e PI2 que amplificam uma região de 105 pares de base da região ITS-1 de *P. insidiosum*, e tem sido utilizado em estudos para identificação da espécie *P. insidiosum* (BOTTON et al., 2011).

3.1.2 Pitiose

A pitiose é uma infecção de rápida evolução e difícil tratamento. Possui distribuição mundial, ocorrendo em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (MENDOZA et al., 1996). Porém, ocorre com maior frequência em áreas pantanosas e alagadiças, sendo endêmica na Tailândia (Krajaejum et al., 2006) e no

Brasil, destacando-se o Mato Grosso do Sul (Pantanal) e o Rio Grande do Sul como os estados brasileiros com a maior ocorrência da doença (LEAL et al., 2001; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2014; WEIBLEN et al., 2016). Todavia, a infecção pode ser observada em diversos estados brasileiros (SANTURIO et al., 2006). Nas regiões endêmicas, Pantanal e a região Sul do Rio Grande do Sul (RS) as com prevalências estimadas são de 12,5% (SANTOS et al., 2011) e 14,5%, respectivamente (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012).

Os mamíferos afetados adquirem a enfermidade ao entrar em ambientes pantanosos, permanecendo nestes locais por longo período (CHAFFIN et al., 1995). Em épocas de maior precipitação pluviométrica, pelo acúmulo de águas paradas, há uma tendência no aumento dos casos clínicos em equinos, porém a pitiose pode ser observada durante todo o ano (MENDOZA et al., 1996, MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012).

A pitiose afeta diversos mamíferos, sendo os equinos, humanos e caninos as espécies mais afetadas (GAASTRA et al., 2010). Dentre as espécies domésticas, os equinos são os mais suscetíveis e se infectam ao entrar em contato com áreas alagadas com presença de zoósporos de *P. insidiosum*. Nestes animais, a enfermidade caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões cutâneas ulcerativas, de evolução rápida, formando grandes massas teciduais de bordas irregulares e aparência tumoral. No interior das lesões observa-se abundante tecido conjuntivo fibroso de consistência firme e aspecto arenoso e ramificadas (*kunkers*) que facilmente se desprendem da lesão (CHAFFIN et al., 1995; MENDOZA et al., 1996). Os *kunkers* auxiliam no diagnóstico da doença, porém ao se desprenderem da lesão em ambientes favoráveis, refazem o ciclo biológico mantendo a contaminação do ambiente (FONSECA et al., 2014). Já nas demais espécies, estas estruturas não são observadas e a doença se manifesta na forma de piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (MILLER et al., 1983; FOIL et al., 1984; GROOTERS, 2003).

Em caninos, as lesões gastrintestinais são as mais comuns (Grooters, 2003), enquanto as formas cutâneas/subcutâneas com desenvolvimento de lesões ulcerativas são frequentes nas demais espécies, incluindo bovinos (Pérez et al., 2005; Grecco et al., 2009;), ovinos (Tabosa et al., 2004), caprinos (DO Carmo et al., 2015) e felinos (Bissonnette et al., 1991; Rakich et al., 2005; Fortin et al., 2017; Soares et al., 2019; Dowst et al., 2019). Relatos em espécies silvestres também são descritas na literatura, incluindo caso de pitiose em dromedário (Wellehan et al.,

2004), onça-pintada (Camus et al., 2004), tigre de bengala (Buergelt et al., 2006), caraúna (Pesavento et al., 2008), camelo (Wellehan et al., 2004; Videla et al., 2012) e avestruz (souto et al., 2019)

Em humanos a pitiose é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, sendo comum na Tailândia (KRAJAEJUM et al., 2006), manifestando-se nas formas cutânea, subcutânea, ocular, vascular e sistêmica (SALIPANTE et al., 2012; SCHLOEMER et al., 2013; KHUNKHET et al., 2015; LELIEVRE et al., 2015; SERMSATHANASAWADI et al., 2016; NEUFELD et al., 2018; CHITASOMBAT et al., 2018).

A pitiose é uma doença progressiva e rápida, que se não tratada leva a espécie afetada à morte. Todavia, dificuldades no tratamento da doença são frequentemente relatadas em todas as espécies afetadas. A ausência de ergosterol na membrana plasmática dos oomicetos explica parcialmente a pobre responsividade aos fármacos antifúngicos que atuam na síntese desta molécula (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003).

A cirurgia é descrita como o melhor protocolo de tratamento, entretanto, as taxas de recidiva (45%), bem como as áreas anatômicas envolvidas (membros, região ventral, boca e trato gastrointestinal) tornam esta prática, em algumas situações, difícil de ser adotada (CHAFFIN et al., 1995, MENDOZA, 2009; GAASTRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2013).

A imunoterapia é uma alternativa para o tratamento da pitiose equina e tem sido utilizada desde 1981, quando Miller propôs o primeiro protocolo com hifas inativadas de *P. insidiosum*. Posteriormente, várias pesquisas empregaram outras formulações de imunoterapia na pitiose equina, obtendo índices de cura que variaram de 50 a 83% (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA et al., 1992; MONTEIRO, 1999; SANTURIO et al., 2003). Embora seja considerada uma prática segura, com índices de cura de aproximadamente 60-70% em equinos, há muitos casos não responsivos a imunoterapia (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Os resultados terapêuticos não satisfatórios no tratamento da pitiose empregando os protocolos tradicionais (cirurgia, imunoterapia e fármacos antifúngicos) têm impulsionado, nos últimos anos, o desenvolvimento de pesquisas que visam à busca de novos compostos e/ou protocolos mais eficazes no combate a *P. insidiosum*. Neste sentido, vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm avaliado o emprego

de princípios ativos diferentes dos antifúngicos convencionais, incluindo compostos antibacterianos e quelantes de ferro (Zanette et al., 2013; Tondolo, 2013; Jesus et al., 2014; Jesus, 2016; Ramappa et al., 2017; Loreto, 2018; Chatterjee; Agrawal, 2018; Bagga et al., 2018); compostos naturais (Fonseca et al., 2015; Araujo; Bosco; Sforcin, 2016; Valente, 2016a,b,c; Trolezi; Azanha, 2017); compostos metálicos (Ribeiro et al., 2017; Valente et al., 2019; Valente et al., 2020), bem como compostos nanoparticulados (Valente et al., 2016a; Valente et al., 2019; Valente et al., 2020).

3.2. *Culex quinquefasciatus* Say 1823

Os mosquitos (Diptera, Culicidae) apresentam grande importância na saúde humana e animal, pois podem atuar como vetores e transmissores de agentes patogênicos, incluindo malária, arboviroses e filarioses (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 2002).

Culex quinquefasciatus Say 1823 (FIGURA 4) ocorre em todas as regiões do Brasil, sendo, também considerado um inseto cosmopolita. A presença do homem contribui fortemente para a distribuição e abundância destes insetos (FORATTINI et al., 1993) e relatos de Cardoso et al. (2010) demonstram que *C. quinquefasciatus* é encontrado em todas as áreas do Rio Grande do Sul (RS) com adensamento humano. Cardoso; Corseuil; Barata (2005) encontraram *C. quinquefasciatus* em 11 regiões fisiogeográficas RS, demonstrando que esta espécie possui ampla distribuição neste estado. Adicionalmente, Felchicher (2018) demonstrou que o culicídeo que apresentou maior abundância em coletas de insetos na região sul do RS foi *C. quinquefasciatus*, sendo o maior número de indivíduos coletados no ambiente rural. Neste mesmo estudo, esse autor também verificou alto grau de sinantropia dessa espécie.



Figura 4- Fêmea de *Culex quinquefasciatus*, por CDC/James Gathany disponível em http://iti.mooc.campusvirtual.fiocruz.br/ext_module

C. quinquefasciatus possui hábitos noturnos, quando as fêmeas realizam a hematofagia, o que causa incomodo ao homem e aos animais (NATAL et al., 1991), uma vez que a picada pode causar irritações e alergias (TAIPE- LAGOS; NATAL, 2003). Além disso, é o principal vetor do vírus Oropouche, filariose linfática e vírus do Nilo Ocidental (NATAL et al., 1991; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 2002; SARDELIS et al., 2001). Estudos adicionais apontam como possível vetor do Zika vírus (GUEDES et al., 2017).

O ciclo biológico de *Culex sp*, é caracterizado por uma parte aquática (imaturos) e fase terrestre os adultos (FIGURA 5)

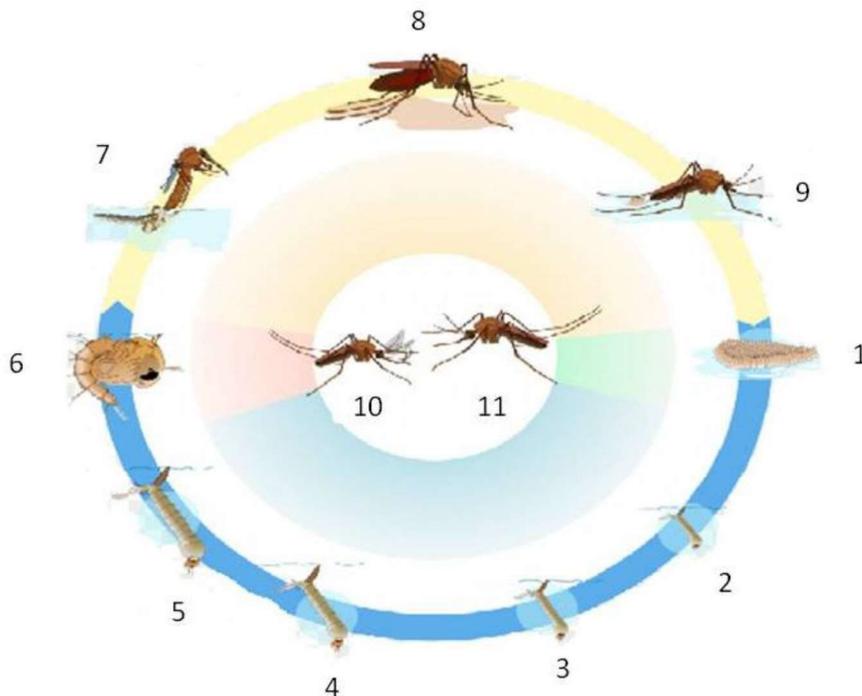


Figura 5- Ciclo Biológico de *Culex sp.*: em 1- Ovos; 2- Larva em estágio L1; 3- Larva em estágio L2; 4- Larva em estágio L3; 5- Larva em estágio L4; 6- Pupa; 7- pupa emergindo o adulto; 8- Adulto; 9- Fêmea depositando os ovos; 10- Mosquito macho; 11- Mosquito fêmea.

Os ovos de *C. quinquefasciatus* são depositados sobre a lâmina de água em forma de jangada e cada postura tem de 150 a 250 ovos (Consoli; Oliveira, 1994). Cerca de dois a quatro dias após a ovipostura há a eclosão dos ovos (FIGURA 6)



Figura 6- Jangada de ovos de *Culex quinquefasciatus*, CDC/Harry Weinburgh disponível em http://lti.mooc.campusvirtual.fiocruz.br/ext_module

As larvas de culicídeos (FIGURA 7A) são aquáticas, respiram o oxigênio do ar e possuem alta mobilidade. Em condições ambientais, o período larval varia de 6 a 31 dias, tendo um período médio de 10 dias quando a temperatura ambiente for superior a 18°C (VIANNA; COSTA; RIBEIRO, 1996). Na fase de pupa o inseto não se alimenta (FIGURA 7B), há transformação no corpo para a fase adulta e mudanças do meio aquático para o terrestre. Este processo dura cerca de dois dias em condições normais, até a eclosão do adulto (FORATTINI, 2002). Os adultos são terrestres e alimentam-se de substâncias açucaradas, porém as fêmeas são hematófagas, pois o repasto sanguíneo está ligado ao desenvolvimento de ovos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 2002).

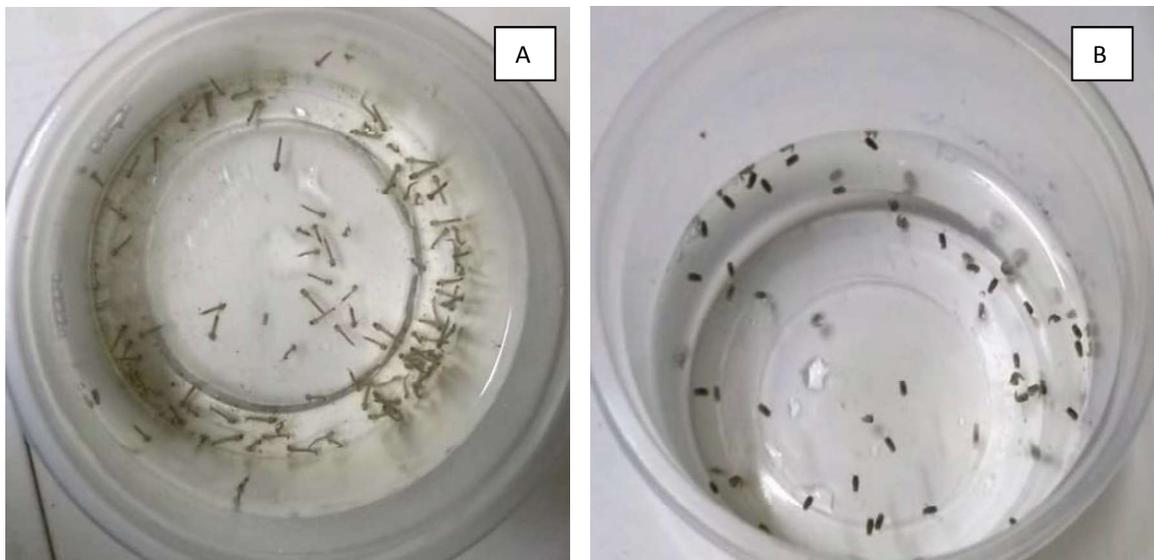


Figura 7A- Larvas de *C. quinquefasciatus* em estágio L3; Figura 7B- Pupas de *C. quinquefasciatus*

Os gêneros *Aedes* e *Culex*, albergam diversas espécies que atuam na transmissão de agentes etiológicos de várias doenças como filariose linfática, febre amarela, encefalites, dengue, zika e chikungunya (SERVICE, 2004; FOSTER 2009)

Interessantemente, Schurko et al. (2003) relataram que o isolado de *P. insidiosum* recuperado de larvas de *C. quinquefasciatus* na Índia compartilhava características moleculares similares a outros isolados de *P. insidiosum* oriundos de humanos e equinos provenientes da Austrália, Estados Unidos, Índia, Japão, Nova Guiné e Tailândia. No entanto, os pesquisadores que recuperaram o isolado oriundo de *C. quinquefasciatus* não publicaram o relato na época, faltando assim, a descrição das características do micro-organismo, bem como das prováveis alterações patológicas observadas nas larvas infectadas (VILELA et al., 2018).

No Brasil, Vilela et al. (2018) relataram o isolamento e caracterização de três isolados de *P. insidiosum* oriundos de larvas de *Aedes aegypti* no Estado de Tocantins, sugerindo que este oomiceto apresenta afinidade por hospedeiros invertebrados, podendo utilizar larvas de mosquitos e nematoides para completar seu ciclo de vida e, conseqüentemente, expandir seu nicho ecológico. A análise filogenética empregando as sequências ITS e COXII classificaram esses três isolados de *P. insidiosum* no mesmo *cluster*, de cepas de *P. insidiosum* provenientes de humanos e animais oriundos das Américas.

Na pitiose em animais, comumente observa-se que as lesões cutâneas nas espécies afetadas ocorrem em regiões que estão em maior contato com a água (MILLER; CAMPBELE, 1982; CHAFIN et al., 1995; MENDOZA et al., 1996), o que é justificado pelo ciclo biológico de *P. insidiosum*. Todavia, os relatos de infecção em animais e humanos sem histórico de contato com ambientes aquáticos, bem como a ocorrência de lesões em regiões do corpo com pouca probabilidade de contato com águas contaminadas (Bissonnette et al., 1991; Wellehan et al. 2004, Pierezan et al. 2009; Soares et al., 2019 Santos et al. 2011; Videla et al., 2012), induzem a questionamentos a respeito da presença de outras fontes de infecção, incluindo o contato com outros propágulos de *P. insidiosum*, assim como hifas, oósporos, oogônia (Mendoza et al., 1996) e até mesmo a aspiração de zoósporos aeroliz (Camus et al., 2004). Neste contexto, os culicídeos poderiam atuar como provável fonte de infecção.

4. Manuscrito

Manuscrito em construção a ser submetido à Revista Acta Tropica

Infecção de imaturos e adultos de *Culex quinquefasciatus* por *Pythium insidiosum*

Infecção de imaturos e adultos de *Culex quinquefasciatus* por *Pythium insidiosum*

CAROLINE QUINTANA BRAGA¹, ANGELITA MILECH¹, CAROLINA DOS SANTOS BERMANN¹, CARLA WEIBLEN², LARA IANISKI², PAULA STIBBE², WALDENIS DA TRINDADE JÚNIOR¹, ÉLVIA HELENA VIANA¹, JOSIANE BONNEL³, SÔNIA DE AVILA BOTTON², DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA¹.

¹ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

² Departamento Medicina Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

³ Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

4.1. Resumo

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático patógeno para mamíferos. Este micro-organismo habita áreas pantanosas de regiões de clima tropical, subtropical e temperada. Além de utilizar plantas para o desenvolvimento de estruturas de reprodução e infectar animais causando pitiose, *P. insidiosum* foi recuperado de larvas de mosquitos. Este estudo teve como objetivo verificar se *P. insidiosum* é capaz de infectar imaturos e adultos de *Culex quinquefasciatus*. O estudo foi dividido em dois ensaios experimentais. No primeiro ensaio um total de 2400 larvas L1 e L2; 2400 larvas L3 e L4; 1200 pupas e 500 ovos foram expostos aos zoósporos do oomiceto (8×10^3 zoósporos/mL) durante 24 horas. Posteriormente, *pools* de 50 imaturos foram lavados em água destilada estéril, macerados e cultivados em agar bendazol e pentaclorobenzeno. Culturas provenientes das larvas apresentaram características macroscópicas e microscópicas de *P. insidiosum* e através utilizando a técnica de PCR confirmando a presença do oomiceto. Em ovos e pupas não foi possível detectar-se a presença de *P. insidiosum*. Na análise molecular dos imaturos detectou-se a presença de DNA do oomiceto nos *pools* dos estágios L3 e L4. O segundo ensaio avaliou a infecção desde imaturos até adultos. Neste experimento, *P. insidiosum* não foi recuperado dos adultos. A análise histopatológica de L4 infectadas revelou a presença de imagens negativas em HE, bem como estruturas tubuliformes largas e impregnadas pela prata no Grocott, sugestivas de hifas de *P. insidiosum*. Os resultados sugerem que *P. insidiosum* pode utilizar as larvas *C. quinquefasciatus* para a manutenção de seu ciclo biológico nos ecossistemas aquáticos, porém o culicídeo não se constitui num vetor deste micro-organismo aos hospedeiros vertebrados.

Palavras-Chave: Oomiceto, culicídeo, larvas, pupas

Correspondência:

Daniela Isabel Brayer Pereira

Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 18, Sala 14. Campus Universitário Capão do Leão, s/nº. CEP: 96160-000. Tel.: +55 53 32757338; Fax: +55 53 32757338. E-mail danielabraye@gmail.com.

4.2. Introdução

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático, pertencente ao reino Stramenopila, classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae, gênero *Pythium* (ALEXOPOULOS et al., 1996; GAASTRA et al., 2010). Este micro-organismo é responsável pela pitiose, uma doença de evolução rápida que infecta mamíferos, principalmente equinos e humanos (Gaastra et al., 2010).

Ambientes pantanosos, presença de vegetação e temperaturas entre 30° e 40°C, são fatores essenciais para o desenvolvimento de *P. insidiosum* e a ocorrência da pitiose (MILLER; CAMPBELL 1982; Mendoza et al., 1993). Nestes ambientes, *P. insidiosum* coloniza plantas aquáticas para o desenvolvimento de seu ciclo assexuado. Durante o ciclo há a formação de zoósporos infectantes, que são liberados nas águas e movimentam-se até encontrar outra planta onde completam e reiniciam sua reprodução. Todavia, esses zoósporos ao serem liberados nas águas podem ser atraídos para um hospedeiro mamífero, penetram na pele através de lesões pré-existentes e iniciam o processo de infecção, caracterizando a doença (Mendoza et al., 1996).

Culex quinquefasciatus Say 1823 possui comportamento antropofílico e está presente em ambientes aquáticos com água estagnada e acúmulo de matéria orgânica. Temperaturas ambientais acima de 25°C favorecem a ocorrência deste mosquito. *C. quinquefasciatus* é o vetor da filariose bancroftiana (*Wuchereria bancrofti*), bem como também pode estar envolvido na transmissão de arboviroses, incluindo as encefalites virais, febre do Oropouche e febre do Oeste do Nilo (KORTE et al., 2013; DIAZ et al., 2013; NOLAND; BLOUNT; GONZALEZ, 2015; CARDOSO et al., 2015). Interessantemente, Schurko et al. (2003) ao realizar a análise filogenética

de isolados de *P. insidiosum* observaram que a cepa deste oomiceto recuperada de larvas de *C. quinquefasciatus* na Índia, agrupou-se no *cluster* II, juntamente com isolados de *P. insidiosum* provenientes de humanos e equinos oriundos da Austrália, Estados Unidos, Japão, Nova Guiné e Tailândia. No entanto, informações sobre a descrição das características do oomiceto, bem como das condições de isolamento e das prováveis alterações patológicas observadas na larva infectada não estão disponíveis na literatura (VILELA et al., 2018).

No Brasil, Vilela et al. (2018) relataram o isolamento e caracterização de três isolados de *P. insidiosum* oriundos de larvas de *Aedes aegypti* no Estado de Tocantins. A análise filogenética empregando as sequências ITS e COXII classificaram esses três isolados de *P. insidiosum* no *cluster* I (conforme classificação de Schurko et al., 2003), juntamente com cepas de *P. insidiosum* provenientes de humanos e animais oriundos das Américas. , Esses autores sugerem que este oomiceto apresenta afinidade por hospedeiros invertebrados, podendo utilizar larvas de mosquitos e nematoides para completar seu ciclo de vida e, conseqüentemente, expandir seu nicho ecológico.

Na pitiose, normalmente há o histórico de acesso dos indivíduos a ambientes aquáticos, locais onde *P. insidiosum* desenvolve seu ciclo biológico gerando zoósporos infectantes. No entanto, relatos de infecção em animais e humanos sem histórico de contato com esses ambientes, bem como a ocorrência de lesões em regiões do corpo com pouca probabilidade de contato com águas contaminadas (Bissonnette et al. 1991; Wellehan et al. 2004, Pierezan et al. 2009; Soares et al., 2019; Santos et al. 2011; Videla et al. 2012), induzem a questionamentos a respeito da presença de outras fontes de infecção, incluindo o contato com outros propágulos de *P. insidiosum*, assim como hifas, oósporos, oogônia (Mendoza et al., 1996) e até mesmo a aspiração de zoósporos aerolizados (Camus et al. 2004). Neste contexto, os culicídeos poderiam atuar como uma provável fonte de infecção. Considerando que as larvas dos culicídeos e *P. insidiosum* compartilham o mesmo nicho ecológico e que este oomiceto já foi isolado de larva de *C. quinquefasciatus* (Schurko et al., 2003) e *A. aegypti* (Vilela et al., 2018) torna-se importante conhecer a participação destes insetos na epidemiologia da pitiose, bem como no ciclo biológico de *P. insidiosum*. Até o momento relata-se o encontro do oomiceto em larvas, todavia, não se tem informações se mosquitos adultos podem albergar e/ou atuar como vetores mecânicos desse patógeno.

O presente estudo teve como objetivo avaliar, em condições experimentais, a infecção de imaturos e adultos de *C. quinquefasciatus* por *P. insidiosum*.

4.3. Material e métodos

Culex quinquefasciatus: os espécimes do culicídeo pertencem ao Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)/RS e a colônia foi estabelecida conforme protocolo previamente descrito por VIANNA; COSTA; RIBEIRO (1996).

Produção de zoósporos de P. insidiosum: neste estudo empregou-se uma cepa padrão oriunda de equino (CBS 101555) para obtenção dos zoósporos. A zoosporogênese foi realizada conforme metodologia previamente descrita por Mendoza e Prendas (1988) com modificações. Brevemente, o isolado de *P. insidiosum* foi repicado para placas de Petri contendo o meio de cultivo agar levedura 0,1%, juntamente com fragmentos de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavados a 121°C por 20 minutos. As placas foram incubadas por 5 dias à 37°C. Após esse período, os fragmentos de grama foram transferidos para uma placa de Petri contendo 30 mL de meio de indução [(K₂HPO₄ (1,0 M), KH₂PO₄ (1,0 M), (NH₄)₂HPO₄ (3,66 M), MgCl₂·6H₂O (0,5 M), CaCl₂·2H₂O (0,5 M)] e incubada em estufa de agitação orbital a 70 rpm durante 6 horas/37°C. Após este período os zoósporos foram quantificados em câmara de Neubauer. Para a infecção dos imaturos de *C. quinquefasciatus* foi utilizado um inóculo de aproximadamente 8 x 10³ zoósporos/mL (PEREIRA et al. 2007).

Ensaio experimental 1: Infecção de formas imaturas de C. quinquefasciatus com zoósporos de P. insidiosum

Neste experimento, um total de 2400 larvas (48 *pools*) em estágio L1 e L2; 2400 larvas (48 *pools*) em estágio L3 e L4; 1200 pupas (24 *pools*) e 500 ovos (10 *pools*) foram avaliados na análise microbiológica. Todas as formas imaturas de *C. quinquefasciatus* avaliadas foram acondicionadas em recipientes plásticos contendo 500 mL de água deionada, em sala climatizada (\pm 25°C, UR 70%, fotoperíodo 12:12). O experimento foi realizado em duplicata e em duas repetições realizadas em momentos diferentes.

A cada recipiente contendo as fases imaturas de *C. quinquefasciatus* foi adicionado um volume de 30 mL de meio de indução contendo aproximadamente 8×10^3 zoósporos de *P. insidiosum*/mL. O grupo controle negativo foi elaborado da mesma maneira, porém recebeu 30 mL de meio de indução sem zoósporos de *P. insidiosum*. Vinte e quatro horas após a exposição com zoósporos de *P. insidiosum*, pools contendo 50 imaturos de *C. quinquefasciatus* (ovo; L1 e L2; L3 e L4 e pupa) foram coletados e a detecção de *P. insidiosum* nos imaturos foi determinada pelo cultivo microbiológico e reação em cadeia de polimerase (PCR). Em cada fase foi avaliado o desenvolvimento, taxa de mortalidade e motilidade das larvas de *C. quinquefasciatus*.

Cultivo microbiológico para detecção da infecção por P. insidiosum em formas imaturas de C. quinquefasciatus: após 24 horas da inoculação das formas imaturas com zoósporos de *P. insidiosum*, formas imaturas (n=50) de cada fase foram coletadas e lavadas 4 vezes. Posteriormente foram maceradas para isolamento de *P. insidiosum*. Alíquotas do macerado foram semeadas em agar Bendazol (AB) e agar pentaclorobenzeno (APCB) (PRESSER & GOSS, 2015). As placas foram incubadas a 37°C/48 horas e colônias suspeitas de *P. insidiosum* foram identificadas por suas características macro e micromorfológicas. Posteriormente, as culturas obtidas foram submetidas à análise molecular. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle negativo e para análise da presença de *P. insidiosum* na água declorada.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção da infecção por P. insidiosum em formas imaturas de C. quinquefasciatus: No mesmo momento da coleta das formas imaturas para análise microbiológica, L1 e L2 (n=2400), L3 e L4 (n=2400) e pupas (n=1200) foram processadas e divididas em pools de 400 larvas e pupas, para a extração de DNA total de *P. insidiosum* e *Nested* PCR, conforme previamente descrito por Botton et al., (2011). O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle negativo.

Análise histopatológica: Larvas em estágio L4 infectadas (n=37) e controle (n=37) foram coletadas e acondicionadas em frascos contendo formalina 10%. Posteriormente foram rotineiramente processadas para análise histopatológica e

submetidas à coloração de hematoxilina-eosina (H&E) e método de metenamina de prata (Grocott).

Ensaio experimental 2: Avaliação da infecção por P. insidiosum desde L1 até adultos de Culex quinquefasciatus

Neste ensaio experimental, após a eclosão dos ovos de *C. quinquefasciatus*, um volume de 50 mL de meio de indução contendo aproximadamente 8×10^3 zoósporos de *P. insidiosum*/mL foi adicionado ao recipiente contendo 2000 mL de água de clorada e aproximadamente 1000 larvas em estágio L1. Após 24 horas, 100 larvas em estágio L1, divididas em *pools* de 50 larvas, foram coletadas e processadas para cultivo microbiológico de *P. insidiosum* e detecção de DNA total, conforme descrito no ensaio experimental 1. A mesma metodologia foi realizada com as demais formas imaturas (L2, L3, L4 e pupa). Após emergir os adultos, 400 exemplares fêmeas foram coletados e processados para análise microbiológica (n=200) e detecção de DNA total de *P. insidiosum* (n=200) conforme descrito no ensaio experimental 1. O grupo controle negativo foi elaborado empregando-se a mesma metodologia, porém recebeu 50 mL de meio de indução sem zoósporos de *P. insidiosum*. O experimento foi realizado em duplicata e em duas repetições realizadas em momentos diferentes.

Em todos os ensaios experimentais foi monitorada a presença de *P. insidiosum* na água de clorada utilizada para a criação das formas imaturas. Para isso, alíquotas de 10 mL de água foram coletadas em cada fase de desenvolvimento do culicídeo e alíquotas de 100µL foram semeadas, em duplicata, nos meios AB e APCB.

4.3. Resultados

Evidenciou-se que todos os estágios larvais foram infectados com zoósporos de *P. insidiosum*. Observou-se que 24 horas após a semeadura dos *pools* de larvas havia o crescimento de colônias características do oomiceto (Figura 1A). A análise microscópica das colônias revelou a presença de hifas cenocíticas que apresentavam raras septações e ramificações em ângulo reto condizentes com hifas

de *P. insidiosum* (Figura 1B). A análise molecular (*Nested PCR*) das culturas obtidas das larvas evidenciou bandas de 105 pares de bases que confirmaram a identificação de *P. insidiosum*. Por outro lado, nos estágios de ovo, pupa e adulto não foi possível detectar a presença do oomiceto.

Os parâmetros de desenvolvimento, taxa de mortalidade e motilidade das larvas de *C. quinquefasciatus* infectadas com zoósporos de *P. insidiosum* não demonstraram alterações durante do período de infecção.

Na análise molecular dos imaturos e adultos foi possível detectar a presença de DNA de *P. insidiosum* (bandas de 105 pares de bases) apenas no *pool* dos estágios larvais de L3 e L4. Nos demais imaturos (L1 e L2, pupa), bem como nos adultos não foi possível a amplificação do gene analisado pela reação.

Na histologia das larvas L4 infectadas com *P. insidiosum* evidenciou-se aparência normal da cabeça, tórax e abdômen. As células do epitélio do intestino apresentam núcleos desordenados, além de apresentarem estruturas tubuliformes e arredondadas no corpo gorduroso, próximo ao tecido epitelial e tegumento, tais estruturas não são encontradas em larvas não infectadas. Adicionalmente, estruturas tubuliformes largas e impregnadas pela prata foram evidenciadas no Grocott (Figura 2B). Estas estruturas não foram visualizadas nas larvas não infectadas.

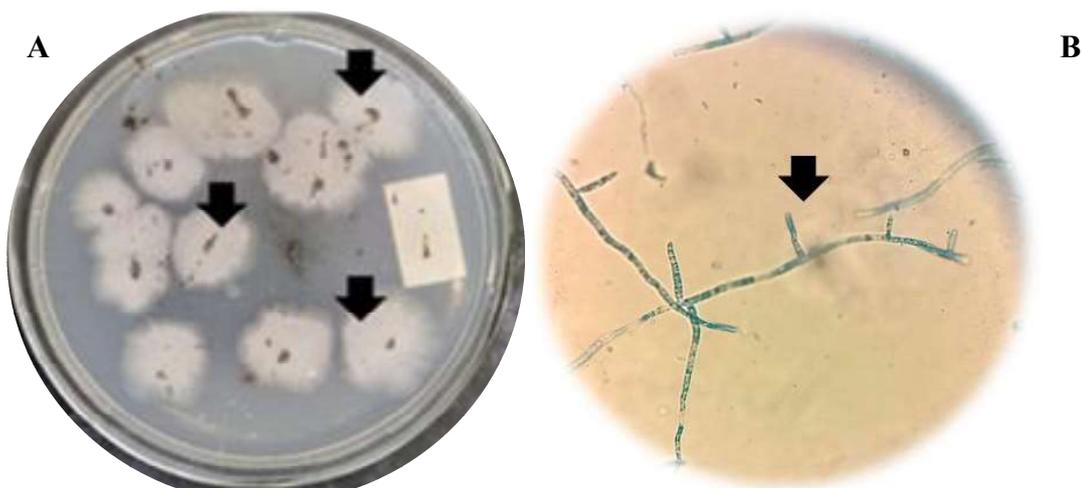


Figura 1: A. Cultivo de *Pythium insidiosum* a partir de larvas de *C. quinquefasciatus* infectadas com zoósporos do oomiceto. Nota-se o crescimento de micélio abundante e de coloração esbranquiçada (setas). Cultura em agar bendazol, incubado a 37°C/48h. B. Microscopia óptica a partir do cultivo obtido das larvas de *C. quinquefasciatus* infectadas. Hifas de *P. insidiosum*, cenocíticas evidenciando raras

septações e ramificações em ângulo reto (seta). Coloração com azul de algodão. Objetiva 400X.

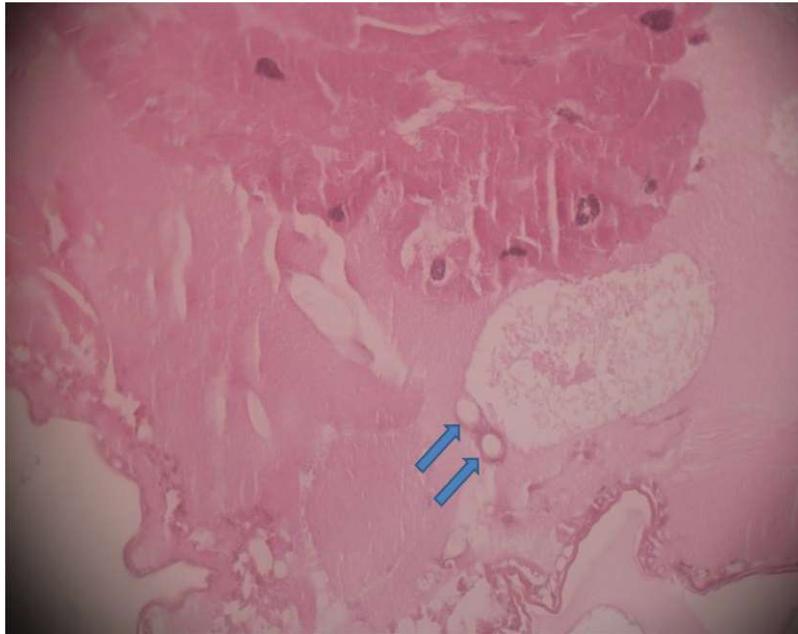


Figura 2A: Microscopia de larva de *Culex quinquefasciatus* (L4) infectada por *Pythium insidiosum*. Nota-se a presença de imagens negativas sugestivas de hifas de *P. insidiosum* (seta) no intestino médio da larva. H&E (400X).

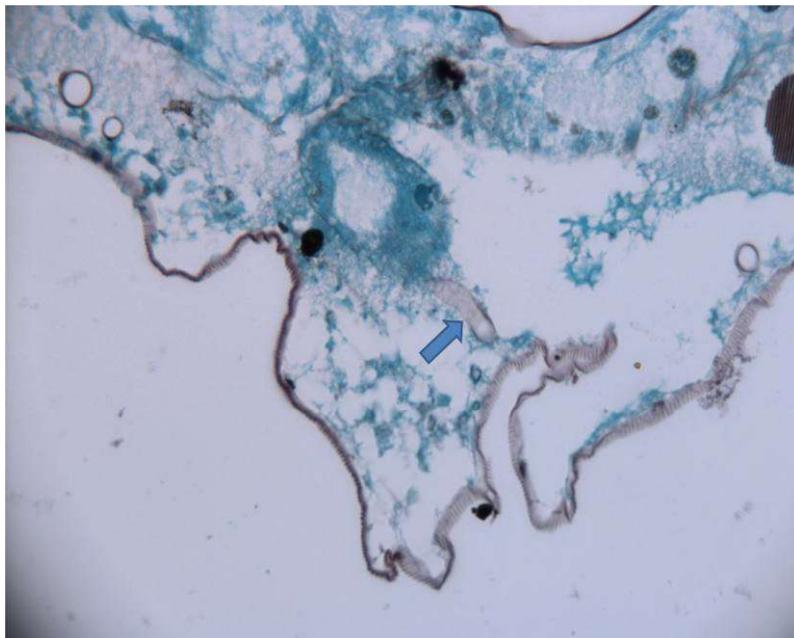


Figura 2B: Microscopia de larva de *Culex quinquefasciatus* (L4) infectada por *Pythium insidiosum*. Nota-se a presença de estruturas tubuliformes largas e impregnadas pela prata (seta). Grocott (1000X).

4.4. Discussão

Pythium insidiosum é um importante oomiceto, classificado como parte dos Straminopiles, Alveolata e Rhizaria (SAR), um super-grupo do reino Straminipila (Adl

et al., 2012; Mendoza e Vilela, 2013; Beakes et al., 2014) que engloba gêneros patógenos para mamíferos (*Pythium insidiosum* e *Lagenidium*) (Beakes et al., 2012; Mendoza, Vilela, 2013; Rujirawat et al., 2018), como também oomicetos patógenos para mosquitos, incluindo *Lagenidium giganteum* (Mendoza, Vilela, 2013), *Pythium guiyangense* (Shen et al., 2019), *Crypticola clavulifera* (Mendoza et al., 2018) e *Leptolegnia chapmanii* (Gutierrez et al., 2017).

É comprovado que *P. insidiosum* habita ecossistemas pantanosos (Miller, 1983; Supabandhu et al., 2008, Presser; Gross, 2015; Zambrano et al., 2017). Nesses habitats, utiliza plantas para completar seu ciclo reprodutivo assexuado produzindo zoósporos móveis e biflagelados, capazes de infectar mamíferos (MENDOZA et al., 1996; MENDOZA; VILELA 2013). No entanto, Vilela et al. (2018) questionam o fato de que *P. insidiosum* pode desenvolver seu ciclo de vida apenas utilizando plantas, uma vez que esse patógeno foi cultivado de uma larva de mosquito infectada na Índia (Schurko et al., 2003). Corroborando esse questionamento, esses mesmos autores (Vilela et al., 2018) relataram o isolamento e a caracterização de três isolados de *P. insidiosum* a partir de larvas de *Aedes aegypti* coletadas no Estado de Tocantins, Brasil.

No presente estudo ao avaliar-se, em condições experimentais controladas, a capacidade de *P. insidiosum* infectar imaturos e adultos de *C. quinquefasciatus* demonstrou-se que esse oomiceto foi capaz de infectar os estágios imaturos de L1, L2, L3 e L4. Evidenciou-se que *P. insidiosum* foi cultivado a partir de *pools* dos estágios larvais analisados, bem como foi possível a amplificação do DNA do oomiceto, comprovando a infecção das larvas. Adicionalmente, na análise histológica dos estágios larvais L4 evidenciou-se, pela técnica de Grocott, a presença de estruturas tubuliformes impregnadas pela prata, sugestivas de hifas de *P. insidiosum*. Esses resultados corroboram Schurko et al. (2003) e Vilela et al. (2018), comprovando que *P. insidiosum* é capaz de infectar os estágios larvais de mosquito.

Nosso estudo foi pioneiro ao avaliar a infecção durante todos os estágios de desenvolvimento de *C. quinquefasciatus*. Estudos prévios que relataram a infecção de *C. quinquefasciatus* (Schurko et al., 2003) e *Aedes aegypti* (Vilela et al., 2018) por *P. insidiosum* apenas avaliaram o estágio larval dos insetos.

No entanto, no estágio de ovo, pupa e adulto de *C. quinquefasciatus* não foi possível detectar-se a presença do oomiceto. A ausência da infecção nos ovos foi

esperada, uma vez que os ovos são depositados em forma de “jangada” sobre a lâmina de água, não ficando submersos. Além disso, possuem uma cutícula serosa quitinizada que os protege da entrada de patógenos (FORATTINI 2002). Desta forma, acredita-se que nos ecossistemas aquáticos, onde *P. insidiosum* e *C. quinquefasciatus* compartilham o mesmo ambiente, a probabilidade de infecção dos ovos seria dificultada. Segundo Ravishankar et al. (2001) e MacDonald et al. (2002), *P. insidiosum* não é capaz de invadir tecidos intactos. Esses autores evidenciaram que os ápices das hifas desse oomiceto exerceram forças de 6,9 μ N quando submetidas ao contato em diferentes superfícies, incluindo pele humana e animal. Todavia, observaram que esta força não foi suficiente para penetrar o tecido intacto, mostrando, portanto, que este patógeno requer lesões prévias para infectar os tecidos do hospedeiro, o que foi observado por outros autores (Grooters, 2003; Mendoza et al., 1996).

A fase de pupa em *C. quinquefasciatus* é curta. Ela não se alimenta e sofre uma série de mudanças fisiológicas, pois este estágio é intermediário entre a vida essencialmente aquática e a vida terrestre (adultos) (FORATTINI 2002). No presente estudo demonstrou-se que em pupas oriundas de L4 infectadas não foi possível detectar-se *P. insidiosum*. Consequentemente, o oomiceto também não foi detectado em adultos oriundos destas pupas. Este resultado foi surpreendente, uma vez que se esperava encontrar pupas também infectadas. Desta forma, outras pesquisas precisam ser realizadas para explicar este resultado. O processo de transformação de estágio de pupa para adulto envolve várias modificações, incluindo a eliminação de certos órgãos larvais e a formação de outros de fase adulta (Forattini, 1996; Forattini, 2002; Triplehorn; Johnson, 2011). Talvez mecanismos fisiológicos, histológicos e metabólicos de transformação possam contribuir para a eliminação do micro-organismo do interior das pupas. Todavia, estudos são necessários para comprovar tal hipótese.

A ausência de alterações histológicas na coloração de H&E, bem como a ausência de alterações dos parâmetros de desenvolvimento, taxa de mortalidade e motilidade das larvas infectadas com zoósporos de *P. insidiosum*, sugerem que este oomiceto não atua como provável agente de controle biológico de *C. quinquefasciatus*. Esta característica difere de outras espécies de *Pythium* e outros oomicetos que são relatados como importantes controladores biológicos de

mosquitos (Mendoza, Vilela, 2013; Gutierrez et al., 2017; Mendoza et al, 2018; Shen et al., 2019).

A infecção de mamíferos com *P. insidiosum* frequentemente ocorre quando há o acesso dos indivíduos a ambientes aquáticos contaminados com zoósporos. No entanto, relatos de infecção em animais e humanos sem histórico de contato com esses ambientes, bem como a ocorrência de lesões em regiões do corpo com pouca probabilidade de contato com águas contaminadas (Bissonnette et al. 1991; Wellehan et al. 2004, Pierezan et al. 2009; Soares et al. 2019; Santos et al. 2011; Videla et al. 2012), induzem a dúvidas com respeito a presença de outras fontes de infecção, incluindo o contato com outros propágulos de *P. insidiosum*, assim como hifas, oósporos, oogônia (Mendoza et al., 1996) e até mesmo a aspiração de zoósporos aerolizados (CAMUS et al., 2004). Adicionalmente, a recuperação de *P. insidiosum* de larva de *C. quinquefasciatus* na Índia (Schurko et al., 2003) e de larvas de *A. aegypti* no Brasil (Vilela et al., 2018) sugerem a participação dos culicídeos como uma provável fonte de infecção.

Nesta pesquisa, demonstrou-se que *P. insidiosum* infectou apenas larvas de *C. quinquefasciatus*, sendo incapaz de continuar a infecção nos estágios de pupa e adulto. Diante deste resultado acredita-se que o culicídeo não tem participação na transmissão de *P. insidiosum* aos hospedeiros suscetíveis, uma vez que apenas adultos fêmeas com hábitos de hematofagia poderiam atuar como vetores. Por outro lado, concorda-se com Vilela et al. (2018) que sugerem que este oomiceto apresenta afinidade por hospedeiros invertebrados, podendo utilizar larvas de mosquitos e nematoides para completar seu ciclo de vida e expandir seu nicho ecológico. Contudo, maiores estudos são requeridos para verificar as interações de *P. insidiosum* com os culicídeos em seus ecossistemas.

4.5. Conclusão

Os resultados desta pesquisa evidenciam que *P. insidiosum* é capaz de infectar os estágios larvais L1, L2, L3 e L4 de *C. quinquefasciatus*, mas não os estágios de ovo, pupa e adulto. Sugere-se que o oomiceto utiliza as larvas desse hospedeiro invertebrado para manutenção de seu ciclo de vida nos ecossistemas aquáticos, pois as larvas infectadas não originaram adultos infectados, contudo não se constitui num vetor deste micro-organismo aos hospedeiros vertebrados.

4.6. Referências

- ADL, S.M. et al. Revised classification of eukaryotes. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 59, p. 429–493, 2012.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: _____. **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 683-737.
- BEAKES, G.W., GLOCKLING, S.L., SEKIMOTO, S. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. **Protoplasma**. v. 249, p.3-19, 2012.
- BEAKES, G.W., HONDA, D., THINES, M., Systematic of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. In: Systemic and Evolution, **The Mycota, VIII Part A**, D. J. McLaughlin, and J.W. Spatafora, (Eds.). 2 ed., Springer - Verlag, Berlin Heidelberg, 2014, p. 39–97.
- BISSONNETTE, K. W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v.29, p.39-44, 1991.
- BOTTON, S.A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in Cutaneous Lesions of Brazilian Horses and Rabbits. **Curr. Microbiol.** v.62, p.1225–1229, 2011.
- CAMUS, A.C.; GROOTERS, A.M.; AQUILAR, R.F. Gramulomatus pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar. *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.16, p. 567-571, 2004.
- CARDOSO, B. F. et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 745–754, 2015.
- DIAZ, L. A. et al. Transmission of endemic St Louis encephalitis virus strains by local *Culex quinquefasciatus* populations in Cordoba, Argentina. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 107, p. 332–334, 2013.
- FORATTINI, O. P. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 2 - Immature stages research at a rice irrigation system location in South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.27, p.227-236, 1993.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Medica**. Volume 2. São Paulo: Edusp. 2002.

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

GUTIERREZ, A.C. et al. *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes) as a future biorational tool for the control of *Aedes aegypti* (L.). **Acta Tropica**. v.169, p.112-118, 2017.

KORTE, R.L. et al. Survey of Bancroftian filariasis infection in humans and *Culex* mosquitoes in the western Brazilian Amazon region: implications for transmission and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 46, n. 2, p.214-220, 2013.

LERKSUTHIRAT. T. et al. Evolution of the Sterol Biosynthetic Pathway of the Sterol Biosynthetic Pathway of *Pythium insidiosum* and Related Oomycetes Contributes to Antifungal Drug Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemother**. n. 4, p. 1-37, 2017.

MACDONALD, E. et al. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genetics and Biology**. v. 37, p. 245-249, 2002.

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

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

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

MENDOZA, L.; VILELA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**, v.7, n.3, p.198-208, 2013.

MENDOZA, L.; et al. Taxonomic and phylogenetic analysis of the Oomycota mosquito larvae pathogen *Cryptocola clavulifera*. **Fungal Biology**, v.122, p. 847-855, 2018.

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

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

NOLAND, G.S. BLOUNT, S. GONZALEZ, M. Post-Mass Drug Administration Transmission Assessment Survey for Elimination of Lymphatic Filariasis in La Ciénaga, Dominican Republic. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 93, n.6, p. 1292–1294, 2015

PEREIRA, D. I. et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **J Antimicrob Chemother.** v. 60, n.5, p.1168-1171, 2007.

PIEREZAN, F. et al. Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 equinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.3, p. 275-280, 2009.

PRESSER, J. W.; GOSS, E. Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. **Medical Mycology**, v.00, p.1–10, 2015.

RAVISHANKAR, J.P. et al. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 34, p. 161-175, 2001.

RUJIRAWAR, T. et al. Probing the phylogenomics and putative pathogenicity genes of *Pythium insidiosum* by oomycete genome analyses. **Scientific Reports**. V.8, n.1, 4135, 2018.

SANTOS, C. E. P. et al. Pitiose em animais de produção no Pantanal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.12, p.1083-1089, 2011.

SHEN, D. et al. Infection mechanisms and putative effector repertoire of the mosquito pathogenic oomycete *Pythium guiyangense* uncovered by genomic analysis. **PLoS Genet.** v.15, n.4, 2019.

SOARES, L.M.C. et al. Feline subcutaneous pythiosis. **Ciência Rural**. v. 49, n.03, 2019.

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

SCHURKO, A., MENDOZA, L., DE COCK, A.W., KLASSEN, G.R. Evidence for geographic clusters: molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia** v.95, n. 2 p. 200–208, 2003.

TRIPLEHORN, C. A. JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. 7. Ed. São Paulo: Cengage learning, 2011. 809p.

VIANNA, E. E. S. COSTA, P. R. P. RIBEIRO, P. B. Oviposição e longevidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições ambientais, em Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, p.47-52, 1996.

VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology**, v.50, n.2, p.219-224, 2012.

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

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

ZAMBRANO, C.G. et al. Influence of temperature on *in vitro* zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 00, n. 00, p.1-7, 2017.

5. Conclusões

- *P. insidiosum* foi detectado em todos os estágios de larvas de *C. quinquefasciatus*, porém nas fases de ovo, pupa e adulto não foi possível verificar-se a presença do oomiceto.
- Presença de estruturas similares a hifas na análise histopatológica de larvas L4 de *C. quinquefasciatus* infectadas de *P. insidiosum* sugere que este oomiceto é capaz de causar a invasão dos tecidos das larvas.
- A presença de meio de indução contendo zoósporos de *P. insidiosum* não afetou o desenvolvimento, a motilidade de larvas e pupas de *C. quinquefasciatus*.

6. Referências

ADHIKARI, B. N. et al. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. **PLOS One**. v.8, n. 10, p. e75072, 2013.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 683-737.

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

ARAUJO, M.J. et al. *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.4, p.863-869, 2016.

BAGGA, B. et al. Leap forward in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis. **British Journal of Ophthalmology**. v.102, n.12, p. 1629-1633, 2018.

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

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

BOTTON, S.A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in Cutaneous Lesions of Brazilian Horses and Rabbits. **Curr. Microbiol.** v.62, p.1225–1229, 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, p. 567-571, 2004.

CARDOSO, J. C. CORSEUIL, E. BARATA, J. M. S. Culicinae (Diptera, Culicidae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.49, n.2, p.285-287, 2005.

CARDOSO, B. F. et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 110, n. 6, p. 745–754, 2015.

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

CHATTERJEE, S. AGRAWAL, D. Azitromycin in the management of *Pythium insidiosum* keratitis. **Cornea**, v.37, n.2, p. e8-e9, 2018.

CHITASOMBAT, M. N et al. Clinicopathological feature and outcomes of pythiosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v.71, p.99-41, 2018.

CONSOLI, Rotraut A. G. B. OLIVEIRA, Ricardo L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228p.

CONSOLI, Rotraut A. G. B. OLIVEIRA, Ricardo L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998. 224p.

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

DO CARMO, P. M.; et al. Cutaneous pythiosis in a goat. **Journal of Comparative Pathology**, v.152, n.2-3, p.103-105, 2015.

DOWST, M. et al. An unusual case of cutaneous feline pythiosis. **Medical Mycology**, v. 60 p. 57-60, 2019.

FELCHICHER, F. **Levantamento de mosquitos (Diptera: Culicidae) e investigação do potencial epidemiológico na transmissão de arboviroses na Planície Costeira, RS**. 2018. 93f. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

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

FOIL, C.S.O. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**. p. 57-63, 1996.

FONSECA, et al. *In vitro* reproduction of the life cycle of *Pythium insidiosum* from kunkers' equine and their role in the epidemiology of pythiosis. **Mycopathologia**. v. 177, n.1-2, p.123-127, 2014.

FONSECA, 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.253-258, 2015.

FORTIN, J.S., et al., Sublingual pythiosis in a cat. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.59, n.1, p.63, 2017.

FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I.; MASSAD, E.; MARUCCI, D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 2 - Immature stages research at a rice irrigation system location in South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.27, p.227-236, 1993.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Medica**. Volume 2. São Paulo: Edusp. 2002.

FOSTER, W. A. WALKER, E. D. Mosquitoes (Culicidae). In: MULLEN, G.R.; DURDEN, L.A. **Medical and Veterinary Entomology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2009. p. 201–253.

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

GRECO, F. B. et al. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.11, p.938-942, 2009.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 33, p. 695-720, 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, 2002.

GUEDES, D.R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**. v. 6, n.1, p.1-11, 2017.

HENDRIX, J. W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**, v.144, n.3621, p.1028-1029, 1964.

JESUS, F. P. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin or tybinafine and topical antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.9, p 5621-5625, 2014.

JESUS, F. P. et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin, or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.1, p.87-91, 2016.

JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n.3, p.693-715,2004.

KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Disease**, v.43, p.569-576, 2006.

KAGEYAMA, K. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 4, p.314-326, 2014.

KHUNKHET, S. RATTANAEMAKORN, P. RAJATANAVIN, N. Pythiosis presenting with digital gangrene and subcutaneous nodules mimicking medium vessel vasculitis. **JAAS Case Reports**, v.1, n. 6, p. 399-402, 2015.

LEAL, A. T. et al. Pitose- Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p. 735-743, jul. 2001.

LELIEVRE, L. et al. Imported *Pythium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler. **American Journal of Medicine and Hygiene**, v.92, n. 2, p. 2170-173, 2015.

LORETO , E.S. **Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Pythium insidiosum* frente a antibacterianos (macrolídeos, oxazolidinonas e pleuromutilinas) em ite fosina** 2018.125f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.9, p.865-868, 2012.

MENDOZA, L. ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**. v.94, p.123-129, 1986.

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

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

MENDOZA, L. et al. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.11, p.2980-2983, 1992.

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

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

MENDOZA, L. *Pythium insidiosum* and mamalian. In: LAMOUR, k. EKAMOUN, S. (Ed.). **Oomycete genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Reseach Tools**. 1 ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2009. Cap.19, p. 3887-405.

MENDOZA, L.; VILELA, R. The mamalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**, v.7, n.3, p.198-208, 2013.

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

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

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

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

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamental of the fungi**. 4^a ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996.

NATAL, D.; PAGANELLI, C. H.; SANTOS, J. L. H. Composição da população adulta de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823 em ecótopos próximos à represa Edgard de Souza, no município de Santana do Parnaíba, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.35, p.539–543, 1991.

NEUFELD, A. et al. *Pythium insidiosum* keratitis: a pictorial essay of natural history. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v.53, n.2, p. e48-e50, 2018.

PEREIRA, D.I.B. et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**, v.176, p.309–15, 2013.

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

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

PIEREZAN, F. et al. Achados de necropsia relacionados coa a morte de 335 equinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.3, p. 275-280, 2009.

PRESSER, J. W. GOSS, E. Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. **Medical Mycology**, v.00, p.1–10, 2015.

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

RAMAPPA, M. et al. Successful medical management of presumptive *Pythium insidiosum* Keratitis. **Cornea**, v.36, n. 4, p. 511-514, 2017.

RIBEIRO, T.C. et al. *In vitro* susceptibility of the oomycete *Pythium insidiosum* to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese or zinc. **Medical Mycology**, v. 55, p.669-672, 2017.

SALIPANTE, S. J. et al. Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection using PCR screening and DNA sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**. v.50, n. 4, p. 1480-1483, 2012.

SANTOS, C. E. P.; et al. Pitiose em animais de produção no Pantanal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.12, p.1083-1089, 2011.

SANTOS, C.E.P. et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian Pantanal and nearby areas: Results of 76 cases. **J. Equine Vet. Sci.** v. 34 p. 270–274, 2014 .

SANTURIO, J. M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**, v.163, n.9, p.2176-7, 2008.

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

SARDELIS, M. R. et al. Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquillettidia* mosquitoes for West Nile virus. **Emerg. Infect. Dis.** v.7, p. 1018-1022. 2001.

SCHLOEMER, N. J. et al. Fatal disseminated *Pythium insidiosum* infection in a child with diamond-Blackfan anemia. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v.21 n.4, p.e24-e26, 2013.

SERMSATHANASAWADI, N. et al. Outcomes and factors influencing prognosis in patients with vascular pythiosis. **Journal of Vascular Surgery**, v.64, n.2, p.411-417, 2016.

SOUTO, E.P.F. et al. Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio camelus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.71, n.3, p.1081-1084, 2019.

SOARES, L.M.C. et al. Feline subcutaneous pythiosis. **Ciência Rural**. v.49, n.03, 2019.

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

SCHURKO, A. et al. Evidence for geographic clusters: molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia** v.95, n. 2 p. 200–208, 2003.

SERVICE, M. W. **Medical Entomology for Students**. 3ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. **Veterinary Pathology**, v.41, p.412-415, 2004.

TAIPE-LAGOS, C.B. NATAL, D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. **Revista de Saúde Pública**. v.37, n.3, p. 275-9, 2003

TONDOLO, J. S. M. et al. Chemically induced disseminates pythiosis in BALB/c mic: A new experimental model for *Pythium insidiosum* infection. **PLoS One**, v.12, n.5, p. e0177868, 2017.

TROLEZI R et al. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobial**. v.1, p.1-7, 2017.

VIANNA, E. E. S. COSTA, P. R. P. RIBEIRO, P. B. Oviposição e longevidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições ambientais, em Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, p.47-52, 1996.

VALENTE, J.S.S. In Vitro Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in Its Free Oil and Nanoemulsion Formulations Against *Pythium insidiosum*. . **Mycopathologia**. 2016a.

VALENTE, J.S.S., *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. **Mycopathologia**.v.181, n.5-6, 2016b.

VALENTE, J.S.S. et al. *In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Jornal of Applied Microbiology**. v.121, n.4, p.998-1003 2016c.

VALENTE, J.S.S, et al. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**. v.57, n.7, p. 858–863, 2019.

VALENTE, J.S.S. et al. Biogenic silver nanoparticles in the treatment of experimental pythiosis Bio-AgNP in pythiosis therapy. **Medical Mycology**. V.0, p. 1-6, 2020.

VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology**, v. 50, n.2, p. 219-24, 2011.

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

VINITTANAKOM, N. et al. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 3970-3974, 2004.

WEIBLEN, C. et al., Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.46, n.1,p. 126-131, 2016.

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

ZANETTE ,R.A et al. Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. **Veterinary Microbiology** v. 162, p. 826–830, 2013.

ZAMBRANO, C.G. et al. Influence of temperature on *in vitro* zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 00, n. 00, p.1-7, 2017.