

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/02/2018.



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE BOTUCATU



CARACTERIZAÇÃO DO *Pythium insidiosum* POR ABORDAGEM PROTEÔMICA

JÉSSICA LUANA CHECHI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Micro-organismos*.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco

BOTUCATU-SP

2016



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE BOTUCATU



CARACTERIZAÇÃO DO *Pythium insidiosum* POR ABORDAGEM PROTEÔMICA

JÉSSICA LUANA CHECHI

SANDRA DE MORAES GIMENES BOSCO

LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Microorganismos*.

BOTUCATU-SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cechi, Jéssica Luana.

Caracterização do *Pythium insidiosum* por abordagem proteômica / Jéssica Luana Cechi. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Coorientador: Lucilene Delazari dos Santos

Capes: 21201030

1. Pitiose. 2. Proteômica. 3. Eletroforese bidimensional.

Palavras-chave: Eletroforese bidimensional; Pitiose; Proteômica; *Pythium insodiosum*.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.”*

Marthin Luther King

Dedico esta dissertação

*À minha filha, **Camille Chechi de Souza**,
que me impulsiona ir além à cada nova fase.
Obrigada pelo amor infinito, amizade, paciência e
por sua capacidade em me trazer paz e alegria.*

*Aos meus pais,
Rubens Benedito de Chechi e Maria Rosalina de Chechi,
que não medem esforços para me ajudar a conseguir chegar cada vez mais longe.*

Agradecimentos

A Deus pela proteção, fé e sabedoria em guiar meus caminhos.

*As minhas amigas **Tarsila, Fernanda e Lidiane**, pelo apoio e companheirismo de sempre. **Tarsila**, agradeço pela confiança, amizade e cumplicidade, tenho certeza que independente dos nossos caminhos, sempre estaremos presentes. **Fernanda**, sou grata pela sua amizade, pessoas como você temos que levar para a vida, muito obrigada por tudo. **Lidiane**, obrigada pela amizade, apoio e conhecimento doados todo este tempo. Sem vocês esta etapa não seria a mesma.*

Á toda minha família que sempre me apoia e torce para o meu sucesso.

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

Aos professores doutores presentes na banca de qualificação, e na defesa da dissertação por aceitarem o convite e disponibilizarem seu tempo na avaliação do trabalho.

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) pela infraestrutura e condições para o desenvolvimento deste trabalho.

Á Prof. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e Aline de Lima Leite, do Laboratório de Bioquímica (Departamento de Ciências Biológicas, USP, Bauru), pela dedicação e parceria nas análises de espectrometria de massas e por me ajudarem na realização do presente trabalho.

Á co-orientadora, Dra. Lucilene Delazari dos Santos, pela paciência, dedicação e conhecimento que muito me ajudou na realização deste trabalho. E finalmente agradeço a Prof. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco pela confiança em aceitar me orientar. Obrigada pela amizade, orientação, carinho e conhecimento repassado.

SUMÁRIO

RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Micro-organismo.....	28
3.2. Protocolos empregados na padronização da extração de proteínas de <i>Pythium insidiosum</i>	29
3.3. Quantificação de proteínas totais	30
3.4. Eletroforese Unidimensional – SDS-PAGE	30
3.5. Eletroforese Bidimensional.....	31
3.6. Aquisição e análises das imagens de géis	32
3.7. Digestão Enzimática <i>in gel</i>	32
3.8. Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas do tipo ESI- Q-ToF e análises de bioinformática	33

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Concentração de proteínas totais e SDS-PAGE 1D.....	34
4.2. Eletroforese bidimensional	35
4.3. Análise dos géis	37
4.4. Digestão Enzimática.....	38
4.5. Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas e Bioinformática.....	39
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS.....	55
7. ANEXOS.....	62
7.1. Dados dos <i>spots</i> sequenciados de <i>Pythium insidiosum</i>	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo de maceração das hifas de *P. insidiosum* em graal e pistilo, na presença de reagentes, em fluxo laminar..... 29
- Figura 2.** Perfil eletroforético em gel de SDS-PAGE 1D dos cinco diferentes protocolos de extração proteica de *Pythium insidiosum*, M = Marcador (GE Healthcare)..... 34
- Figura 3.** Perfil eletroforético 2D de *Pythium insidiosum*, contendo 150 µg de proteínas, fita pH 4-7, 7cm. 35
- Figura 4.** Perfil eletroforético 2D de *Pythium insidiosum*, contendo 600 µg de proteínas, fita pH 4-7, 13cm..... 36
- Figura 5.** Perfil eletroforético 2D de *Pythium insidiosum*, contendo 1000 µg de proteínas, fita pH 4-7, 13cm. 36
- Figura 6.** Géis contendo 1000 µg de proteínas e analisados no *software* Image Master 2D Platinum v 7.05. À esquerda observa-se a seleção de um spot de 43 KDa (em verde) e à direita a conformação tridimensional do mesmo spot nos três géis avaliados..... 37
- Figura 7.** Gel contendo 1000 µg de proteínas, com 103 *spots* enumerados, em destaque as proteínas relacionadas à virulência. 38
- Figura 8.** Rede de interação das proteínas de *Pythium insidiosum* evidenciando as proteínas de virulência e sua interação com proteínas de metabolismo e respiração celular e funções nucleares. A rede de proteínas foi analisada pelo

software *String* e as associações entre as proteínas foram detectadas pela ferramenta KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). As associações proteicas mais fortes são representadas pelas linhas mais grossas..... .44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso da massa micelial de <i>Pythium insidiosum</i> de cada uma das amostras processadas.....	28
Tabela 2. Diferentes concentrações de proteínas nos cinco protocolos.....	34
Tabela 3. Proteínas de <i>Pythium insidiosum</i> agrupadas de acordo com as funções relacionadas à virulência.....	40
Tabela 4. Proteínas de <i>Pythium insidiosum</i> agrupadas de acordo com as funções relacionadas a transporte celular.	40
Tabela 5. Proteínas de <i>Pythium insidiosum</i> agrupadas de acordo com as funções relacionadas a metabolismo celular e respiração celular.	41
Tabela 6. Proteínas de <i>Pythium insidiosum</i> agrupadas de acordo com as funções relacionadas ao núcleo.	43

LISTA DE ABREVIATÖES

BSA- Bovine Serum Albumin

CBB – Coomassie Brilliant Blue

CHAPS – 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DTT – Dithiothreitol

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

ESI – Electrospray ionization

IPG – Immobilized pH gradient

MALDI – Matrix-assisted laser desorption/ionization

PMSF – Phenylmethanesulfonyl fluoride

SDS – Sodium dodecyl sulfate

PAGE – Polyacrylamide gel electrophoresis

TEMED – Tetramethylethylenediamine

TOF – Time of flight

RESUMO

A pitiose, cujo agente etiológico é o oomiceto *Pythium insidiosum*, é uma doença que acomete diversas espécies animais, incluindo-se a humana, sendo mais prevalente em equinos. A doença é de difícil diagnóstico e tratamento. Estudos sobre a caracterização proteica de *P. insidiosum* são escassos. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil proteico de *Pythium insidiosum* por meio da estratégia espectrometria de massas e bioinformática, a fim de identificar fatores de virulência. Para isso, foi padronizada uma técnica de extração de proteínas totais de *P. insidiosum*, as quais foram quantificadas. A partir do protocolo de extração de proteínas foi obtido o perfil das proteínas expressas pelo oomiceto *P. insidiosum* por meio da análise por eletroforese bidimensional. Os géis analisados apresentaram 186 *spots* com massa molecular de 12 a 89 KDa, e ponto isoelétrico entre 4-7, destes 103 foram recortados e sequenciados. Um total de 36 proteínas foram identificadas e agrupadas de acordo com suas funções, seis delas foram classificadas como proteínas relacionadas à virulência - β 1,3 glucano sintetase, Hsp 70, enolase, peroxirredoxina 2, proteína G e proteassoma unidade β . Os resultados do presente trabalho contribuirão para o melhor entendimento dos mecanismos patogênicos de *P. insidiosum*, bem como para novos estudos no campo terapêutico e diagnóstico.

Palavras Chave: *Pythium insidiosum*, Pitiose, Proteômica, Eletroforese bidimensional

ABSTRACT

Pythiosis, whose etiologic agent is the oomycete *Pythium insidiosum*, is a disease that affects several animal species, including human, being more prevalent in horses. The disease has difficult diagnosis and treatment. Studies on protein characterization of *P. insidiosum* are scarce. The objective of this study was to determine the protein profile of *Pythium insidiosum* by mass spectrometry and bioinformatics strategies aiming to identify virulence factors. To this end, an extraction was standardized technique of total proteins of *P. insidiosum*, which were quantitated. From the protein extraction protocol it was obtained the profile of proteins expressed by the oomycete *P. insidiosum* through analysis by two-dimensional electrophoresis. The gels had 186 spots analyzed with molecular weight 12-89 kDa and an isoelectric point of 4-7, 103 of these were cut and sequenced. A total of 36 proteins were identified and grouped according to their functions, six of them were classified as proteins related to virulence - β 1,3 glucan synthase, Hsp 70, enolase, peroxiredoxin 2, G protein and the proteasome β unit. The results of this work will contribute to better understanding of the pathogenic mechanisms of *P. insidiosum* as well as for further studies in the therapeutic field and diagnosis.

Key words: *Pythium insidiosum*, Pythiosis, Proteomics, two-dimensional electrophoresis

1. INTRODUÇÃO

A pitiose é uma doença infecciosa causada por um patógeno do reino Stramenopila, classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae e gênero *Pythium*. São micro-organismos aquáticos não fúngicos encontrados em países com climas tropical e subtropical (ALEXOPOULOS et al., 1996).

As espécies do gênero *Pythium* estão presentes no solo e ambientes aquáticos e possuem distribuição global; são importantes fitopatógenos e causam grandes perdas econômicas na agricultura (GAASTRA et al., 2010). *Pythium insidiosum*, em contraste com outras espécies do gênero *Pythium*, possui a habilidade de infectar humanos e animais (MENDOZA et al., 1993). Calvano et al. (2011) diagnosticaram um caso de pitiose humana, em um soldado de 21 anos de idade (combatente do Afeganistão), causada pelo *Pythium aphanidermatum*.

P. insidiosum é um agente colonizador de plantas aquáticas que se reproduz assexuadamente pela produção de esporângios que, maduros, rompem-se e liberam zoósporos biflagelados, os quais correspondem à forma infectante do patógeno. Estes, livres na água, movimentam-se até encontrar outra planta ou animal com tecido injuriado, onde se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a uma nova hifa, que induz o aparecimento das lesões (MENDOZA et al., 1993, 1996). Estudos discutem a possibilidade da penetração dos zoósporos a partir da pele íntegra, sendo atraídos pelo folículo piloso (SANTURIO et al., 1998).

Pela presença recorrente em regiões com acúmulo de água, o equino é a espécie mais acometida pela doença no mundo. Nestes, as lesões cutâneas são as mais frequentes, acometendo principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toraco-abdominal e se caracterizam por lesões exsudativas granulomatosas de bordas irregulares e pruriginosas. São observadas hifas recobertas por células necróticas que formam massas branco-amareladas denominadas “kunkers”. A forma intestinal também pode estar presente e os animais acometidos apresentam episódios de cólica devido à obstrução do lúmen intestinal (REIS et al., 2003; SANTURIO et al., 2008).

Nos caninos, segunda espécie em termos de prevalência da doença, em geral as infecções caracterizam-se pela formação de piogranulomas

gastrointestinais e cutâneos/subcutâneos. Na manifestação gastrointestinal observa-se, frequentemente, quadros de vômitos, anorexia crônica, perda de peso e diarreia. Em relação às manifestações clínicas das lesões cutâneas, observa-se alopecia, lesões granulomatosas e ulcerações com presença de grande quantidade de células de defesa, como macrófagos e neutrófilos (HOWERTH et al., 1989; GROOTERS, 2003; MENDOZA et al., 2005). Geralmente, os cães afetados são oriundos de áreas rurais ou permaneceram por um período de tempo em locais alagados (DYKSTRA et al., 1999). O primeiro caso de pitiose canina no Brasil foi relatado por Larson et al. (1997) em uma fêmea que apresentava lesão cutânea no membro posterior direito.

A doença pode ainda ser diagnosticada em outros animais domésticos, como em ruminantes e felinos, levando a diferentes quadros clínicos, como linfadenite e arterite (MILLER et al., 1985; RAKICH et al., 2005; SANTURIO et al., 2008).

Em animais selvagens e aves a literatura relata sobre a ocorrência de *P. insidiosum* em dromedário (WELLEHAN et al., 2004), tigre de bengala (BUERGELT et al., 2006), caraúna (PESAVENTO et al., 2008) e lesão vulvar em camelo (VIDELA et al., 2011).

No homem, a doença é comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, podendo também ser encontrada nas Américas e Oceania, manifestando lesões cutâneas e subcutâneas de natureza granulomatosa ou mesmo lesões oculares, como ceratites e úlceras de córnea. Outra manifestação clínica da doença humana é a sistêmica ou vascular, considerada a de maior gravidade por resultar na oclusão dos vasos e/ou aneurisma (TRISCOTT et al., 1993).

O primeiro relato de caso de pitiose humana no Brasil foi descrito no estado de São Paulo, cuja fonte de infecção foi decorrente da atividade de pesca. O diagnóstico conclusivo só foi estabelecido após sequenciamento da região ITS-5.8S do DNA ribossomal, evidenciando a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico, pois a princípio este paciente foi tratado para zigomicose (BOSCO et al., 2005, MARQUES et al., 2006).

O diagnóstico da pitiose é tradicionalmente baseado na associação das manifestações clínicas com exames histopatológicos e isolamento do agente. Em cortes histológicos, observa-se que o *P. insidiosum* cora-se bem pelas

técnicas de Gomori-Grocott e PAS, evidenciando hifas largas, ramificadas e esparsamente septadas, características comuns também de fungos zigomicetos, fato que retarda o diagnóstico, pois frequentemente a pitiose é confundida com zigomicose (KAUFFMAN, 1998).

Por diferir dos fungos verdadeiros na composição de sua parede celular, contém beta-glucanas, hidroxiprolina e pequena quantidade de celulose ao invés de quitina e ausência de ergosterol em sua membrana plasmática (ALEXOPOULOS, 1996). O tratamento com antifúngicos convencionais é considerado pouco eficaz e sua ação contra o *P. insidiosum* é questionável. Comumente são administrados anfotericina B, cetoconazol e compostos iodínicos, como iodeto de potássio e sódio (SANTURIO et al., 2003). Em estudo realizado por McMullan et al. (1977) com fomicoses subcutâneas em equinos (nome anteriormente dado à pitiose equina), observou-se eficiência de 30% no tratamento único com a administração de anfotericina B, 50% na associação do procedimento cirúrgico e administração do fármaco e em 20% não foram detectadas respostas significativas. Ainda, uma pesquisa avaliou a eficácia da administração de anfotericina B pela técnica de perfusão regional intravenosa em membros de equinos diagnosticados com pitiose e submetidos previamente ao procedimento cirúrgico. Os resultados mostraram cicatrização das feridas, sem presença de recidiva, em 92% dos casos (DORIA et al., 2012).

Como já exposto anteriormente, tanto o diagnóstico como o tratamento da pitiose são extremamente difíceis e, seguramente, esta será uma frente de trabalho que deverá estimular a realização de pesquisas visando, a identificação das proteínas expressas por *P. insidiosum* para um melhor entendimento dos mecanismos patogênicos do agente, favorecendo o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento e diagnóstico. Neste sentido, pesquisas realizadas por um grupo da Universidade Mahidol - Tailândia, mostraram, pela técnica de *Western blotting* realizada com soros de pacientes com pitiose, uma proteína com massa molecular de 74 KDa, a qual vem sendo considerada como antígeno imunodominante (KRAJAEJUM et al., 2006). Esta mesma proteína foi investigada por análise de espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) e foi identificada como sendo uma β -glucanase, uma vez que apresentou homologia com proteína semelhante em

Phytophthora infestans, oomiceto filogeneticamente próximo a *P. insidiosum* (KRAJAEJUM et al., 2010).

Em pesquisa realizada por Lerksuthirat et al. (2015), com o secretoma do *P. insidiosum*, foi observada a presença abundante de elicítina, ELI025, proteína encontrada apenas em oomicetos, principalmente em espécies do gênero *Phytophthora* e *Pythium*. Em oomicetos fitopatogênicos, elicítinas estão associadas ao transporte de moléculas e estimulam a defesa da planta. Em teste realizado com anticorpos de coelho anti-ELI025, verificou-se forte reação com ELI025 em *P. insidiosum* e, a partir disto, vem sendo desenvolvido um teste de identificação específico para a espécie. A proteína ELI025 foi encontrada somente em isolados de *P. insidiosum*, quando comparada com outros fungos patogênicos. Em ensaio imunohistoquímico anti-ELI e anti-CFA, realizado com 38 secções histológicas de *P. insidiosum*, observou-se 100% de sensibilidade. A partir dos resultados obtidos com a ELI025, a proteína pode se tornar um biomarcador para a realização de ensaios imunohistoquímicos (INKOMLUE et al., 2016).

Vale ressaltar que pesquisas realizadas por Schurcko et al. (2003) evidenciaram a existência de *cluster* genéticos distintos entre diferentes isolados de *P. insidiosum*. Foram avaliados um total de 31 isolados de *P. insidiosum*, obtidos de humanos, equinos, cães, felinos, ursos e de uma larva de *Culex quinquefasciatus* (mosquito causador de filariose), provenientes dos continentes americano, asiático e Oceania. Observou-se que existem três *clusters* genéticos distintos, sendo que em um deles todos os isolados provenientes do continente asiático foram juntamente agrupados (*cluster* III). Da mesma maneira, todos os isolados do continente americano foram agrupados no *cluster* I.

Uma vez que a abordagem proteômica foi a estratégia investigativa escolhida na presente proposta, cabe ressaltar que, a análise proteômica é o estudo em larga escala das proteínas, usualmente por métodos bioquímicos (ANDERSON et al., 1996; CELIS et al., 1996; WILKINS et al., 1996; WILKINS et al., 1997). Este método eficaz de análise surgiu no final da década de 1970, quando pesquisadores iniciaram a formação de bancos de dados de proteínas, utilizando a técnica de eletroforese de gel bidimensional (GALDOS, 2009). Isso resultou na catalogação extensiva de *spots* nos géis bidimensionais para se

criar bancos de dados das proteínas expressas numa amostra biológica. A proteômica está relacionada com o conjunto de tecnologias que têm por objetivo separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas (O'FARREL,1975). Essas moléculas controlam a maioria dos processos celulares, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (ISFOR, 2002; AEBERSOLD et al., 2003). Tais fatos impulsionaram o desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo deste conjunto de proteínas diferencialmente expressas.

Um estudo proteômico realizado por Lau et al. (2013), com o fungo dimórfico *Penicillium marneffe*, principal causador de micose sistêmica no Sudeste Asiático, revelou que existem 12 tipos diferentes de proteínas expressas, destacando-se a GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato hidrogenase) na fase micelial e HSP 60 (proteína de choque térmico, HSP - heat shock protein) na fase leveduriforme. Os autores hipotetizam que essas proteínas extracelulares estão envolvidas nos processos de colonização no tecido hospedeiro.

De maneira similar, Toyotome et al. (2013) determinaram o principal alérgeno no fungo Basideomiceto *Schizophyllum commune*, um fungo causador de micose broncoalveolar alérgica, sinusite alérgica fúngica e impactação mucosa de brônquios. Por meio de análise de espectrometria de massas foi caracterizada a proteína Sch c 1, a qual apresentou homologia com glucoamilase. Esta proteína foi purificada e empregada em testes sorológicos, sendo observados maiores títulos de IgE e IgG em soros de pacientes quando comparados aos voluntários saudáveis.

Outro importante fungo na micologia médica recentemente estudado pela estratégia da proteômica foi o *Sporothrix brasiliensis*, causador da esporotricose zoonótica no Rio de Janeiro. Por meio da análise de MALDI Tof-Tof, Castro et al. (2013) analisaram que a expressão de Gp70 em isolados de menor virulência foi significativamente maior que nos isolados virulentos, tanto para *S. brasiliensis* como para *Sporothrix schenckii*. Estes autores localizaram também o sítio de produção desta proteína, que é localizado na parede celular do fungo. Projeto similar foi desenvolvido por Rodrigues et al. (2015) explorando a presença e diversidade de anticorpos específicos contra antígenos de *Sporothrix* em gatos com esporotricose, analisando a eficácia

destes anticorpos para sorodiagnóstico. Os extratos estudados incluíram proteínas de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*. A realização da técnica de *Western blotting* indicou a presença da proteína ciclase 3-carboxymuconate, com massa molecular de 60 KDa em amostras de *S. brasiliensis* e de 70 KDa para *S. schenckii*, sendo antígeno imunodominante de esporotricose felina. A análise por eletroforese bidimensional revelou seis isoformas da proteína de 60 KDa no proteoma de *S. brasiliensis*, apresentando semelhança na resposta humoral humana para esporotricose.

A identificação de proteínas imunodominantes vem sendo estudada em microalgas do gênero *Prototheca*. Estes micro-organismos tratam-se de algas unicelulares que causam infecções intramamárias em bovinos e infecções cutâneas e/ ou sistêmicas em diversas espécies animais e no homem (SUDMAN, 1974). Estudo realizado com a espécie *Prototheca zopfii* genótipo 2, revelou, a partir da técnica de *Western blotting*, 28 proteínas e a análise por MALDI-Tof identificou 15 proteínas, sendo quatro delas (malato desidrogenase, S-adenosil-L-homocisteína hidrolase, EF-1 α e Hsp 70) já descritas como imunogênicas em outros patógenos eucarióticos (IRRGANG et al., 2014).

Interessante destacar também que, além de caracterizar antígenos imunodominantes e marcadores de virulência, a estratégia proteômica também é útil para a identificação de micro-organismos de maneira geral. É crescente a demanda de métodos que permitam a identificação precoce de micro-organismos causadores de infecção sistêmica, principalmente as associadas ao ambiente hospitalar (*nosocomial infections*), uma vez que quanto mais cedo se estabelece a etiologia da infecção, melhor é o desfecho para o paciente. Nesse sentido, Valencia-Shelton e Loeffelholz (2014) discutem a realização de técnicas de diagnóstico que não sejam dependentes de cultura. A espectrometria de massas, especialmente MALDI-Tof (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-flight Mass Spectrometry) foi apontada como uma ferramenta para auxiliar na identificação rápida de micro-organismos, no entanto ainda não pode ser usada isoladamente, uma vez que os bancos de dados empregados para as análises ainda não são tão diversos como os bancos de dados de sequências de DNA. Guo et al. (2014) analisaram a concordância na identificação de bactérias por métodos automatizados (VITEK 2), sequenciamento de DNA da região ribossomal 16S e por MALDI-Tof. Foram

analisados um total de 1.025 bactérias, classificadas em 55 espécies e 25 gêneros, sendo que 1.021 (99,6%) e 957 (93,37%) foram corretamente identificadas por MALDI-Tof a nível de gênero e espécie, respectivamente. Observou-se concordância em 92,59% dos dois métodos, no entanto a taxa de erros pela técnica de MALDI-Tof foi menor quando comparada ao VITEK2 (e 5,56% e 6,24%, respectivamente), o que torna esta técnica perfeitamente viável para um futuro próximo devido sua rapidez de execução e baixo custo de análise. Seguindo esta linha de pesquisa, Almeida et al. (2015) realizaram um estudo empregando a técnica MALDI-Tof na diferenciação entre as espécies *Paracoccidioides lutzii* e *Paracoccidioides brasiliensis*, demonstrando que o método é promissor em testes clínicos e laboratoriais para determinar possíveis diferenças entre doenças causadas pelas duas espécies.

A caracterização de proteínas também é estudada na busca de marcadores de virulência para fungos patogênicos relevantes na agricultura. Entre os principais fungos fitopatogênicos, encontram-se o *Fusarium oxysporum* e *Verticillium dahliae*, responsáveis por colonizar o sistema vascular de plantas. A identificação de proteínas secretadas por estes fungos indicaram biomoléculas ricas em cisteínas, indutoras de necrose e enzimas, importantes para a patogenicidade do micro-organismo (SAIN & REP, 2015).

O perfil proteico do oomiceto patogênico de plantas *Phytophthora capsici* revelou um total de 1336 proteínas nas três variedades da espécie (Hd3: tipo selvagem; R3-1 e R3-2: variedades mutantes e resistentes a pyrimorph). A abordagem proteômica utilizando as ferramentas de análises Clusters de Grupos Orthologous de Proteínas (COG) e Kyoto Enciclopédia de Genes e Genomas (KEGG), identificou 35 proteínas envolvidas no modo de ação de pyrimorph contra o patógeno e 62 proteínas relacionadas à resposta ao estresse de *P. capsici* perante ao fungicida. Os resultados permitiram direcionar pesquisas futuras na busca por novos fungicidas (PANG et al., 2015).

Shen et al. (2015) realizaram um estudo envolvendo a expressão proteica de isolados de *Candida glabrata*, patógeno frequentemente diagnosticado em candidíase, resistentes e susceptíveis ao fluconazol. A partir da análise proteômica, identificaram 12 proteínas expressas diferentemente. Destas, oito estavam presentes apenas em isolados resistentes e quatro

expressas somente em isolados susceptíveis ao fluconazol. As proteínas identificadas estavam envolvidas no metabolismo energético, resposta ao estresse e síntese de macromoléculas, podendo estar associadas com o desenvolvimento de resistência de *C. glabrata* ao fluconazol.

Diante do exposto, ressalta-se a importância da identificação de proteínas expressas por *P. insidiosum* a partir da estratégia proteômica. O conhecimento do perfil proteico poderá auxiliar tanto no diagnóstico precoce quanto no campo terapêutico, duas importantes frentes de trabalho que precisam ser pesquisadas na pitiose e em seu agente etiológico.

5. CONCLUSÕES

A padronização da extração de proteínas do *P. insidiosum* permitiu comparar protocolos distintos de obtenção de proteínas e com isso determinar o protocolo de maior rendimento proteico e variabilidade de bandas.

Quanto à extração de proteínas e preparação da amostra para a realização de eletroforese bidimensional os resultados foram satisfatórios. Os isolados avaliados mostraram um perfil proteico bem definido e fiel ao se sobrepor os géis com a mesma quantidade de proteínas.

A caracterização das proteínas majoritárias do *P. insidiosum*, foi realizada por meio das técnicas analíticas eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Foram identificadas 36 proteínas do patógeno, dentre elas destacam-se a β 1,3 glucano sintetase, Hsp 70, enolase, peroxirredoxina-2, proteína G e proteassoma unidade β , as quais foram relacionadas à virulência.

O presente trabalho é inédito, pois a caracterização proteica deste patógeno está sendo descrita pela primeira vez. Estas informações são de extrema valia para o melhor conhecimento do micro-organismo estudado.

6. REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.422, p. 198-207, 2003.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ª ed. New York: John Wiley & sons Inc., 1996.
- ALMEIDA JR, J.N. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for differentiation of the dimorphic fungal species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 1383-1386, 2015.
- ANDERSON, N.G. & ANDERSON, N.L. Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, v.17, p. 443-53, 1996.
- BAUERMEISTER, A. et al. β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, p. 75-86, 2010.
- BAUTISTA-DE LUCIO, V.M. et al. Overexpression of peroxiredoxin 2 in pterygium. A proteomic approach. **Experimental Eye Research**, v. 110, p. 70-75, 2013.
- BOSCO, S.M.G. et al. Human pythiosis Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p. 715-717, 2005.
- BRADFORD, M.M. Quantificação de microgramas de proteína utilizando o princípio da proteína de ligação de corante. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-54, 1976.
- BUERGELT, C. et al. Abdominal pythiosis in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37(2), p.186–189, 2006.
- CALVANO, T.P. et al. *Pythium aphanidermatum* Infection following Combat Trauma. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p. 3710–3713, 2011.
- CASTRO, R.A. et al. Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolates. **Plos One**, v. 8(10), p. e75656- e75656, 2013.
- CAVALHEIRO, P.B. **Caracterização de antígenos imunodominantes de *Pithium insidiosum* reconhecidos por anticorpos de eqüinos, coelhos e bovinos**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

CELIS, J.E.; GROMOV, P.; et al. **Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease:** <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. **FEBS Letters**, v.398, p.129-134,1996.

DEEPE, G.S.Jr. & GIBBONS, R.S. Cellular and molecular regulation of vaccination with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. **Infection Immunity**, v. 70(7), p. 3759-67, 2002.

DJÉBALI, N. et al. Partial Resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* Is Associated with Protection of the Root Stele and Is Controlled by a Major QTL Rich in Proteasome-Related Genes. **MPMI**, v. 22, p.1043–1055, 2009.

DÓRIA, R.G.et al. Treatment of pythiosis in equine limbs using intravenous regional perfusion of amphotericin B. **Veterinary Surgery**, v.41(6), p. 759-65, 2012.

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

EBSTRUP, T. et al. A proteomics study of *in vitro* cyst germination and appressoria formation in *Phytophthora infestans*.**Proteomics**, v. 5, p. 2839 – 2848, 2005.

FUNK, J. et al. The glycolytic enzyme enolase represents a plasminogen-binding protein on the surface of a wide variety of medically important fungal species. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, p. 59-68, 2016.

EROLE, P.; SENTANDREU, M.; ELORZA, M.V.; SENTANDREU, R. The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology**, v. 143, p. 313-320, 1997.

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

GALDOS, A.C.R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos.** [Proteomic analysis of bovine yolk sac]. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Vet. Clin. of North America. Small Animal Practice**, Estados Unidos, v. 33, n. 4, p. 695-720, 2003.

GUO, L. et al. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. **Journal of Thoracic Disease**, v. 6(5), p. 534-538, 2014.

HOWERTH, E.W. et al. Subcutaneous pythiosis in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p. 81-83, 1989.

INKOMLUE, R. et al. Development of an anti-elicitin antibody-based immunohistochemical assay for diagnosis of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, p. 43-48, 2016.

IRRGANG, A. et al. Identification of immunodominant proteins of the microalgae *Prototheca* by proteomic analysis. **New Microbe and New Infect**, v. 3, p. 37-40, 2015.

ISFOR, R.J. Proteomics analysis of striated muscle. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sci.** v.771, p.155-65, 2002.

ISHII, T.; WARABI, E.; YANAGAWA, T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. **Journal of Clinical Biochemistry Nutrition**, v. 50, p. 91-105, 2012.

KAUFFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. **Journal of Mycology**, v.143, p.3-7, 1998.

KLEIN, B. S., TEBBET, B.S. Dimorphism and virulence in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10(4), p. 314–319, 2007.

KNOOPS, B. et al. Multiple Roles of Peroxiredoxins in Inflammation. **Molecules and Cells**, v. 39(1), p. 60-64, 2016.

KOZIK, A. et al. Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. **BMC Microbiology**, 15:197, 2015.

KRAJAEJUN, T. et al. Identification of a Novel 74-Kilodalton Immunodominant Antigen of *Pythium insidiosum* Recognized by Sera from Human Patients with Pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44(5), p. 1674–1680, 2006.

KRAJAEJUN, T. et al. The 74-Kilodalton Immunodominant Antigen of the Pathogenic Oomycete *Pythium insidiosum* Is a Putative Exo-1,3-β-Glucanase. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, p. 1203–1210, 2010.

LARSSON CE, et al. Pitiose canina - Aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. **Anais...Gramado: XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. P.155, 1997.

LAU, S.K.P. et al. Proteome profiling of the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii* extracellular proteins and identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an important adhesion factor for onidial attachment. **FEBS Journal**, v. 280, p. 6613–6626, 2013.

LERKSUTHIRAT, T. et al. The elicitor-like glycoprotein, ELI025, is secreted by the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* and evades host antibody responses. **PLoS ONE**, v. 10 (3), p. e0118547, 2015.

MARCOS, C.M. et al. The multifaceted roles of metabolic enzymes in the *Paracoccidioides* species complex. **Frontiers in Microbiology**, doi: 10.3389, 2014.

MARQUES, S.A. et al. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v.81(5), p.483 – 485, 2006.

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

MENDOZA, L.; AJELLO, L. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical Mycology**, v. 6, p. 151-164, 1996.

MENDOZA, L. et al. Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31(11), p.2967-73, 1993.

MILLER, R.I. et al. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical**, v. 186, p.983-986, 1985.

MORTEL, J.E.V. et al. Cellular Responses of the Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* to Cyclic Lipopeptide Surfactants and Their Dependence on G Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4950-4957, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4^a ed. Sarvier, 2004.

O'FARREL, P.H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250(10), p. 4007-4021, 1975.

OGUSUCU, R. Interações de peroxirredoxinas citossólicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com peróxidos. Estudos cinéticos e funcionais. 2009. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímicas) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PANG, Z. et al. Proteomics profile of the plant-pathogenic oomycete *Phytophthora capsici* in response to the fungicide pyrimorph. **Proteomics**, v. 15, p. 2972-2982, 2015.

PESAVENTO, P.A. et al. Cutaneous Pythiosis in a Nestling White-faced Ibis. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 538–541, 2008.

PORTUONDO, D.L. et al. A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. **Immunobiology**, v. 221, p. 300-309, 2016.

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

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

RODRIGUES, A.M. et al. Proteomics-based characterization of the humoral immune response in Sporotrichosis: toward discovery of potential diagnostic and vaccine antigens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9 (8), p. e0004016, 2015.

SAIN, M. & REP, M. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 23970-23993, 2015.

SANDINI, S., R. LA VALLE, F. DE BERNARDIS, C. MACRÌ, AND A. CASSONE. 2007. The 65 kDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative beta-glucanase adhesion required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity. **Cell. Microbiology**. 9:1223–1238.

SANTOS, L.D. et al. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Proteomics**. v. 11, p. 1403-1412, 2011.

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

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

SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. **Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica**. 1ª ed., Porto Alegre: UFRGS editora, 2008. 111p.

SCHURCKO, A. et al. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and Americas are explored. **Mycology**, v. 95, p. 200-208, 2003.

SHARAFI, G. et al. Phylogenetic analysis of HSP70 gene of *Aspergillus fumigatus* reveals conservation intra-species and divergence inter-species. **Journal of Mycology Research**, v. 2, p. 85-96, 2015.

SHEN, Y. et al. Differentially expressed proteins in fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant isolates of *Candida glabrata*. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 9 (3), p. 191-196, 2015.

SILVA, R.C. et al. Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, doi: 10.3389, 2014.

SILVA, S.P. et al. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Molecular Microbiology**, v. 31(4), p. 1039–1050, 1999.

SILVEIRA, C.P. et al. The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 53-63, 2013.

STASZCZAK, M. Proteasomal degradation pathways in *Trametes versicolor* and *Phlebia radiata*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 537–541, 2002.

SUCHER AJ, CHAHINE EB, BALCER HE. Echinocandins: the newest class of antifungals. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 10, p.1647-57, 2009.

SUDMAN, M.S. Protothecosis a critical review. **American Journal of Clinical Pathology**., v. 61, p. 10-19, 1974.

TOYOTOME, T. et al. Glucoamylase is a major allergen of *Schizophyllum commune*. **Clinical & Experimental Allergy**. v. 44, p. 450–457, 2013.

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

VALENCIA-SHELTON, F. & LOEFFELHOLZ, M. Nonculture techniques for the detection of bacteremia and fungemia. **Future Microbiology**, v. 9 (4), p. 543-559, 2014.

VALLE-MALDONADO, M.I. et al. Phylogenetic analysis of fungal heterotrimeric G protein-encoding genes and their expression during dimorphism in *Mucor circinelloides*. **Fungal biology**, v. 119, p. 1179-1193, 2015.

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

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.

WILKINS, M. R.et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 61-65,1996.

WILKINS, M.R.et al. Proteome research: new frontiers in functional genomics. **Germany: Springer-Verlag**., v.243.1997.

YOO, J.I. et al. Proteomic analysis of intracellular and membrane proteins from voriconazole-resistant *Candida glabrata*. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 4(6), p. 293-300, 2013.

ZHANG, Y.; SCOUMANNE, A.; CHEN, X. G Protein-Coupled Receptor 87: a promising Opportunity for Cancer Drug Discovery. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 2(3), p. 111–116, 2010.