



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

Chechi, Jéssica Luana.

Caracterização do *Pythium insidiosum* por abordagem proteômica / Jéssica Luana Chechi. - 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.

2. OBJETIVOS

Geral:

O presente estudo tem como objetivo geral determinar o perfil proteico de *Pythium insidiosum* por meio da estratégia espectrometria de massas e bioinformática, a fim de identificar fatores de virulência.

Específicos:

- Padronizar uma técnica eficaz para extração de proteínas totais de *Pythium insidiosum*;
- Identificar as massas moleculares e pontos isoelétricos das proteínas extraídas do *P. insidiosum* por eletroforese bidimensional;
- Sequenciar os fragmentos peptídicos extraídos de cada *spot* proteico por espectrometria de massas do tipo *electrospray*;
- Identificar as proteínas por meio do uso da ferramenta de bioinformática proteômica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Micro-organismo

Para a padronização da extração de proteínas de *Pythium insidiosum*, foi utilizado o isolado de *P. insidiosum* denominado “EQ16”, que vem sendo subcultivado quinzenalmente e permanece em estufa a 27°C. Este isolado faz parte do acervo do laboratório de Micologia Médica, do departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

Inicialmente, fragmentos de micélio do isolado foram transferidos para cinco Enlenmeyers, cada qual contendo 100 mL de caldo Sabouraud, e incubados sob agitação (170 rpm) a 37°C por 5 dias. Transcorrido este período, timerosal (concentração final 0,02%) foi adicionado à cultura e a mesma foi mantida *overnight* a 4°C, com o objetivo de inativar o micro-organismo. Após este procedimento, o caldo Sabouraud contendo timerosal foi escoado, a massa micelial lavada com água destilada e posteriormente pesada (**Tabela 1**).

Tabela 1. Peso da massa micelial de *Pythium insidiosum* de cada uma das amostras processadas.

Amostra	Peso (g)
1	1,53
2	1,11
3	1,75
4	1,30
5	0,66

3.2. Protocolos empregados na padronização da extração de proteínas de *Pythium insidiosum*

Foram realizados cinco protocolos para a padronização da extração de proteínas, visando avaliar o rendimento proteico de cada um deles:

- **Protocolo 1:** refere-se ao protocolo descrito por Krajaejun et al. (2006), no qual a massa micelial foi macerada (**Figura 1**) na presença de PMSF (0,1mg/mL), EDTA (0,3mg/mL) e água destilada estéril (qsp 25 mL);
- **Protocolo 2:** massa micelial macerada com inibidor de proteases da Sigma (1,6 mg/mL), EDTA (0,3 mg/mL) e água destilada estéril (qsp 25 mL);
- **Protocolo 3:** massa micelial macerada na presença de inibidor de proteases da Sigma (1,6 mg/mL), EDTA (0,3 mg/mL), SDS 10% [m/v], Tris-HCl (1 M) e água destilada estéril (qsp 25 mL);
- **Protocolo 4:** associação do protocolo 2 com adição de sonicação (Branson Digital Sonifier; 10 ciclos de 30 segundos em banho de gelo, com intervalo de 1 minuto entre eles);
- **Protocolo 5:** associação do protocolo 3 com adição de sonicação.

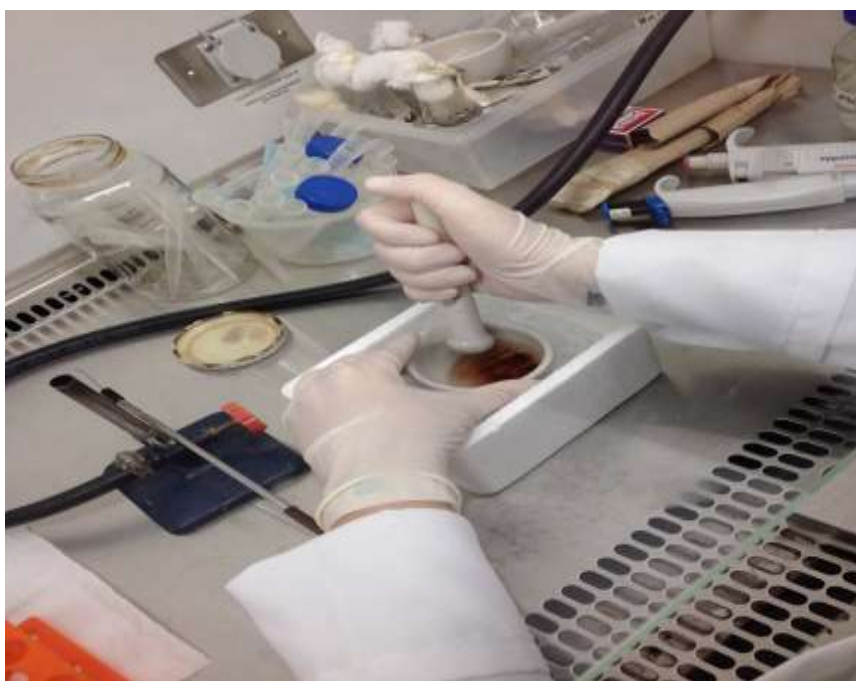


Figura 1. Processo de maceração das hifas de *P. insidiosum* com graal e pistilo, na presença de reagentes, em fluxo laminar.

As amostras foram transferidas, individualmente, de acordo com o teste padrão, para tubos Falcon e centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram coletados e mantidos a – 80°C.

Posteriormente, as amostras foram liofilizadas com o propósito de reduzir o volume das mesmas para a quantificação de proteínas.

3.3. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se albumina bovina (BSA) na concentração de 1mg/mL para obtenção da curva padrão (BRADFORD, 1976).

As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro, em triplicatas, no comprimento de onda de 595 nm. Para o “branco” da leitura foi utilizado Água Ultra Pura e o reagente Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4. Eletroforese Unidimensional – SDS-PAGE

Para a separação das proteínas, foi empregada a técnica de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida a 13% [(m/v) 10x10 cm, 1,5 mm], em sistema vertical.

Foram aliqüotadas 20 µg de proteínas de cada protocolo e liofilizadas. Após a liofilização, foram adicionados 7,5 µL de glicerol a 30% (v/v) e 7,5 µL de tampão da amostra (β-mercaptoetanol, SDS a 10% (m/v), Tris-HCl pH 6,8, glicerol a 100% (v/v), azul de bromofenol) e, em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 70°C por 5 minutos.

Nas canaletas do gel de empilhamento, foram colocados 7 µL do marcador de massa molecular, 97.0-14.4 KDa (GE Healthcare) e as amostras referentes aos cinco protocolos testados. A eletroforese foi realizada em duas etapas, à temperatura ambiente: etapa 1- 150 V, 400 mA por 15 minutos; etapa 2- 200 V, 400 mA por 38 minutos.

Após a separação, as proteínas foram visualizadas a partir de coloração por Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), segundo Santos et al. (2011).

3.5. Eletroforese Bidimensional

Após a padronização do protocolo de extração de proteínas, cinco isolados de *P.insidiosum* (Eq-10, Eq-12, Eq-15, Eq-16 e Eq-20), pertencentes ao acervo do laboratório de Micologia Médica, foram selecionados. A partir do protocolo 3, foi realizada a extração para cada isolado, seguida da quantificação pelo método de Bradford e liofilização.

O produto da liofilização foi ressuspenso em 1mL de água ultra pura (Mili-Q) e um *pool*, oriundo das cinco amostras iniciais, foi submetido à diálise para limpeza. Após a diálise, a amostra foi quantificada e um volume de 576,92 µL, contendo 150 µg de proteínas, foi reduzido em concentrados (*Speed vac*, Eppendorf LoBind).

Para a realização da primeira dimensão foi utilizada a fita (*Immobilized pH Gradients*) de gradiente de pH 4 a 7 com 7 - 13 cm de comprimento. A fita foi reidratada *overnight*, à temperatura ambiente, em 125 µL de uma solução de reidratação, contendo ureia a 8 M, CHAPS 2% (m/v), 1% da solução tampão IPG, 19 mM de DDT e azul de bromofenol, juntamente com 150 µg da amostra. A fita foi submetida ao processo de focalização (Focalizador Isoelétrico IPGphor 3, GE Healthcare) e as proteínas foram separadas conforme seus diferentes pontos isoelétricos. Em seguida, a fita foi equilibrada por 15 minutos em presença de 19 Mm de DDT, 50 Mm de Tris, 6 M de ureia, 30% de glicerol (v/v), 2% de SDS (m/v) e posteriormente por mais 15 minutos, na mesma solução, exceto pela substituição do DTT por 0,2 M de iodoacetamida.

Para a realização da segunda dimensão, a fita de gradiente de pH oriunda da primeira dimensão, foi posicionada no topo de um gel de poli(acrilamida) a 13% (m/v). A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente, utilizando dois passos: 300 V, 20 mA (10 mA por gel) por 15 minutos e depois, 300 V, 40 mA (20 mA por gel) por 78 minutos. Após a separação na segunda dimensão, o gel foi fixado em 50% [v/v] etanol e 5% [v/v] ácido acético

por 30 minutos, em seguida corado com solução 0,025% (m/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (50% [v/v] etanol, 5% [v/v] ácido acético) por 60 minutos. Posteriormente, o gel foi incubado com solução descorante (30% [v/v] etanol, 10% [v/v] ácido acético) por 50 minutos (troca de solução a cada 10 minutos) e conservado em 7% (v/v) ácido acético em solução aquosa (SANTOS et al., 2011).

3.6. Aquisição e análises das imagens de géis

Para obtenção das imagens, os géis 2D foram digitalizados utilizando-se o *scanner* ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) no modo de transmissão calibrado. As imagens dos géis bidimensionais foram analisadas pelo *software* Image Master 2D Platinun v 7.05 (Ge Healthcare). A autenticidade de cada *spot* foi validada por inspeção visual e editada quando necessário.

3.7. Digestão Enzimática *in gel*

Os *spots* de proteínas foram recortados do gel, descorados com solução de etanol 50% (v/v) e ácido acético 2,5% (v/v), e desidratados com acetonitrila 100% (v/v). Então, os fragmentos foram secos por centrifugação à vácuo e digeridos com tripsina, seguindo-se o protocolo: foram dissolvidos 20 g de tripsina não autolítica em 1600 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,0. Cada fragmento foi incubado com 30 μ L da solução de tripsina, durante 30 minutos em banho de gelo; a digestão foi interrompida removendo o excesso de solução de tripsina e adicionando-se 50 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM e mantendo-se a suspensão de gel *overnight* em banho-maria à 37°C. A seguir, foram adicionados na suspensão contendo o gel, 10 μ L de solução de ácido fórmico 5% (v/v), incubados por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi coletado e colocado em novos microtubos (marca Eppendorf, modelo Lobind – volume 0,5 mL); nos tubos contendo os géis foram adicionados 12 μ L de solução de ácido fórmico 5% (v/v) e acetonitrila 50% (v/v), incubados por 10 minutos à temperatura ambiente; o sobrenadante foi coletado e adicionado ao microtudo da etapa anterior. Os sobrenadantes

coletados foram secos por centrifugação a vácuo, sendo então mantidos a – 20°C até serem analisados por espectrometria de massas (SANTOS et al., 2011).

3.8. Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas do tipo ESI-Q-ToF e análises de bioinformática

A análise dos peptídeos trópicos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1,8 µm, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1 % ácido fórmico). Os peptídeos foram separados por um gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 20 min com fluxo de 0,35 µL/min e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 20 min. Os dados obtidos foram processados pelo software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.0 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida pelo algoritmo de contagem de íons incorporado ao software.

Após a espectrometria de massas, os dados foram exportados e submetidos à análise automática com a ferramenta de bioinformática MASCOT v.2.1 (www.matrixscience.com), utilizando os seguintes parâmetros: enzima tripsina; taxonomia *Pythium ultimum* e *Phytophthora infestans* e gênero *Rhizopus*; banco de dados SwissProt; modificação fixa carbamidometilação; modificação variável oxidação da metionina; uma clivagem perdida pela enzima; massa molecular do tipo monoisotópica; erro de tolerância de peptídeos (MS) ± 0,5 Da e erro de tolerância (MS/MS) ± 0,8 Da; protonação + 1 e tipo de instrumento ESI-Tof. Em seguida, as sequências obtidas foram agrupadas segundo suas funções biológicas e posteriormente as sequências de aminoácidos foram avaliadas quanto a rede de interações por meio da ferramenta de bioinformática String 10 (String - Known and predicted protein-protein interactions - <http://string-db.org/>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Concentração de proteínas totais e SDS-PAGE 1D

Os protocolos de extração resultaram em diferentes concentrações de proteína total, as quais podem ser observadas na **Tabela 2** e **Figura 2**.

Protocolos	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	0,1645
2	0,0912
3	6,8713
4	0,0891
5	8,3182

Tabela 2. Diferentes concentrações de proteínas nos cinco protocolos.

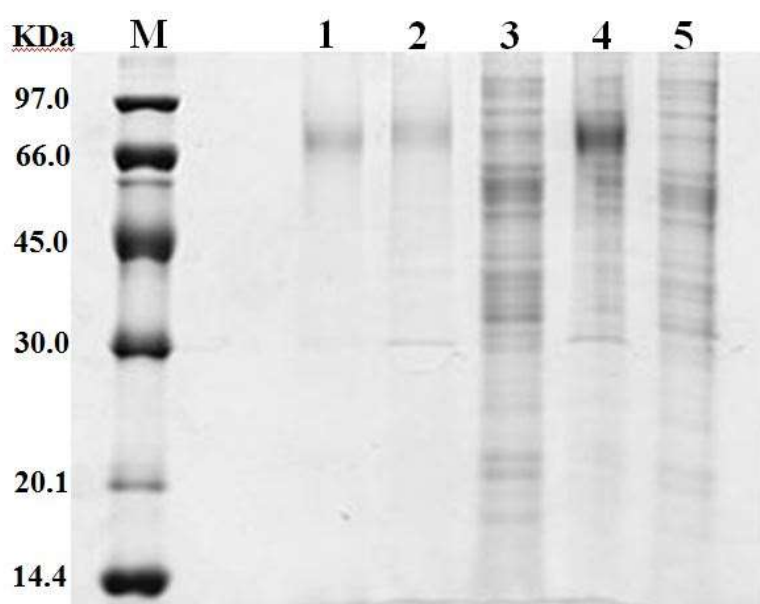


Figura 2: Perfil eletroforético em gel de SDS-PAGE 1D dos cinco diferentes protocolos de extração proteica de *Pythium insidiosum*, M = Marcador (GE Healthcare).

Os protocolos 3 e 5 apresentaram maior absorvância e, portanto, maior quantidade de proteínas quando comparados aos demais, o que pode ser observado no perfil proteico obtido no gel de SDS-PAGE 1D (**Figura 2**). Os

protocolos 1, 2 e 4, não apresentaram resultados favoráveis quanto a quantidade de proteínas, muito provavelmente devido a ausência de um detergente, como SDS utilizado nos demais protocolos, pois o mesmo favorece a lise celular.

Desta forma, o protocolo 3 foi o escolhido para as demais extrações devido à maior quantidade de proteínas com variabilidade de bandas e por não necessitar de sonicação.

4.2. Eletroforese bidimensional

O perfil proteico na eletroforese 2D revelou baixa quantidade de proteína na concentração de 150 µg, sendo que a maioria apresentou-se na faixa de pH 4-5; 97.0 – 30.0 KDa (**Figura 3**). Ao se colocar 600 µg, observou-se uma quantidade maior de proteínas na faixa de pH 5-7; 97.0 – 25.0 KDa (**Figura 4**) e, ao utilizar-se 1000 µg, notou-se a presença de proteínas não visíveis nas concentrações anteriores (**Figura 5**).

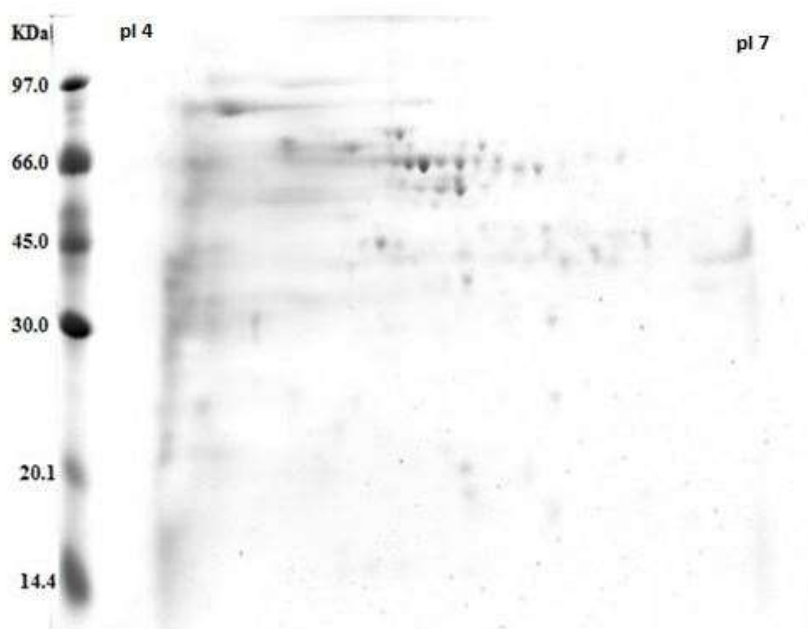


Figura 3. Perfil eletroforético 2D de *Pythium insidiosum*, contendo 150 µg de proteínas, fita pH 4-7, 7 cm.

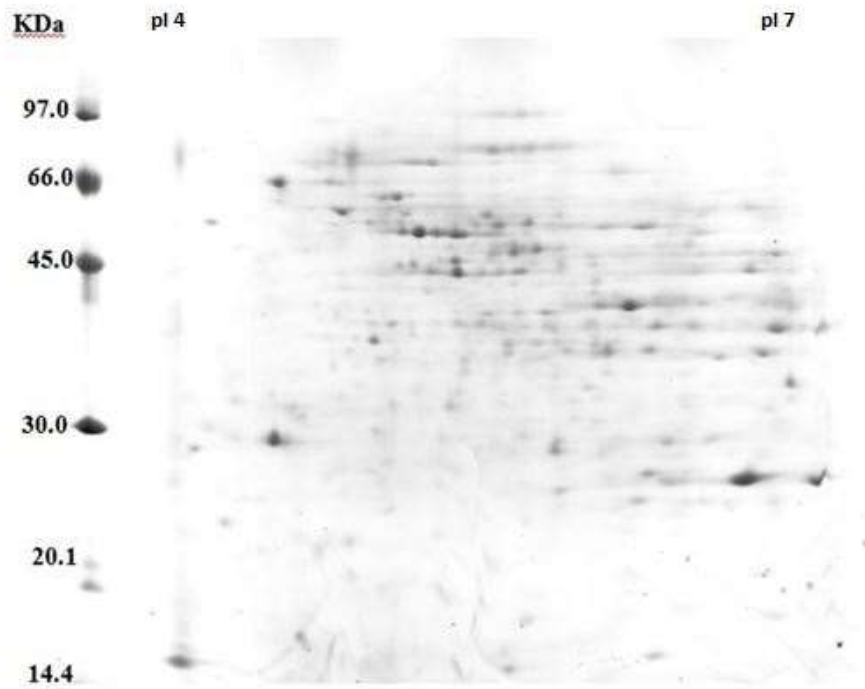


Figura 4. Perfil eletroforético 2D de *Pythium insidiosum*, contendo 600 µg de proteínas, fita pH 4-7, 13 cm.

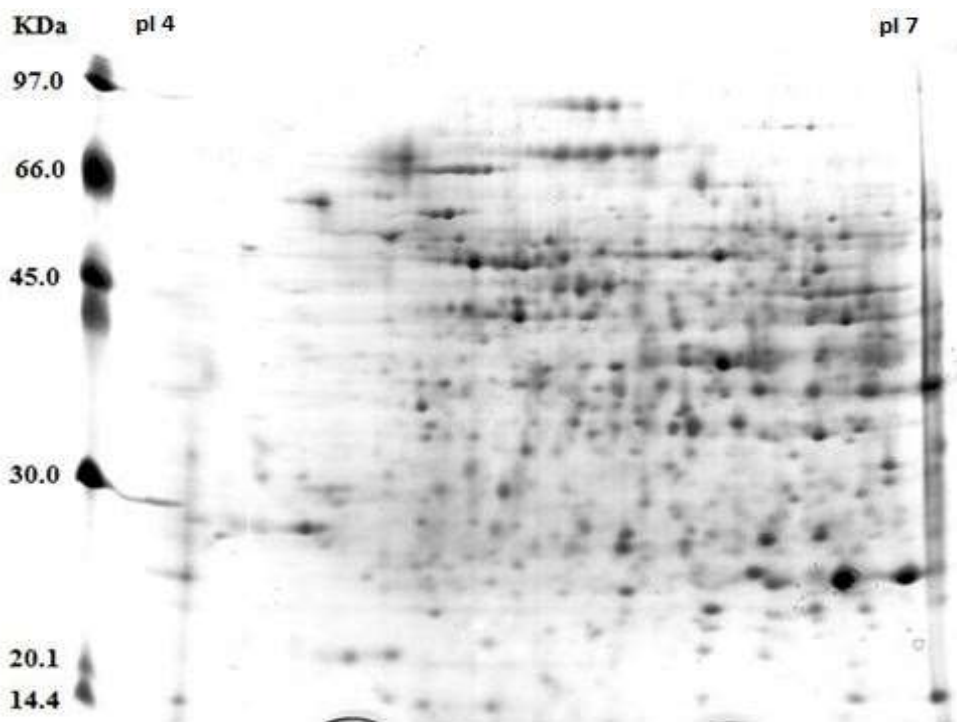


Figura 5. Perfil eletroforético 2D de *Pythium insidiosum*, contendo 1000 µg de proteínas, fita pH 4-7, 13 cm.

Ebstrup et al. (2005) realizaram um estudo proteômico com o oomiceto patógeno de plantas, *Phytophthora infestans*, em estágios diferentes de desenvolvimento e obtiveram um rendimento proteico de 105-120 proteínas em géis de poliacrilamida a partir de eletroforese bidimensional ao adicionarem 400-550 µg de proteínas em fita de pH 3-10, 18 cm.

4.3. Análise dos géis

Géis de poliacrilamida contendo 1,0 mg de proteínas foram analisados no *software* Image Master 2D Platinum v 7.05. O perfil proteico do *P. insidiosum* obteve um rendimento de 186 *spots*, com massa molecular de 12 a 89 KDa, e ponto isoelétrico entre 4-7. Entre os *spots* mencionados, dois foram detectados com massa molecular de 74 KDa e pl 5,79 e 5,88. Vale destacar a relevância da proteína de 74 KDa, a qual vem sendo considerada como antígeno imunodominante. Krajaejun et al. (2006) utilizaram o soro de pacientes com pitiose para avaliação da expressão proteica do patógeno a partir da realização das técnicas de eletroforese unidimensional e *western blot*, observando a presença de uma proteína de 74 KDa.

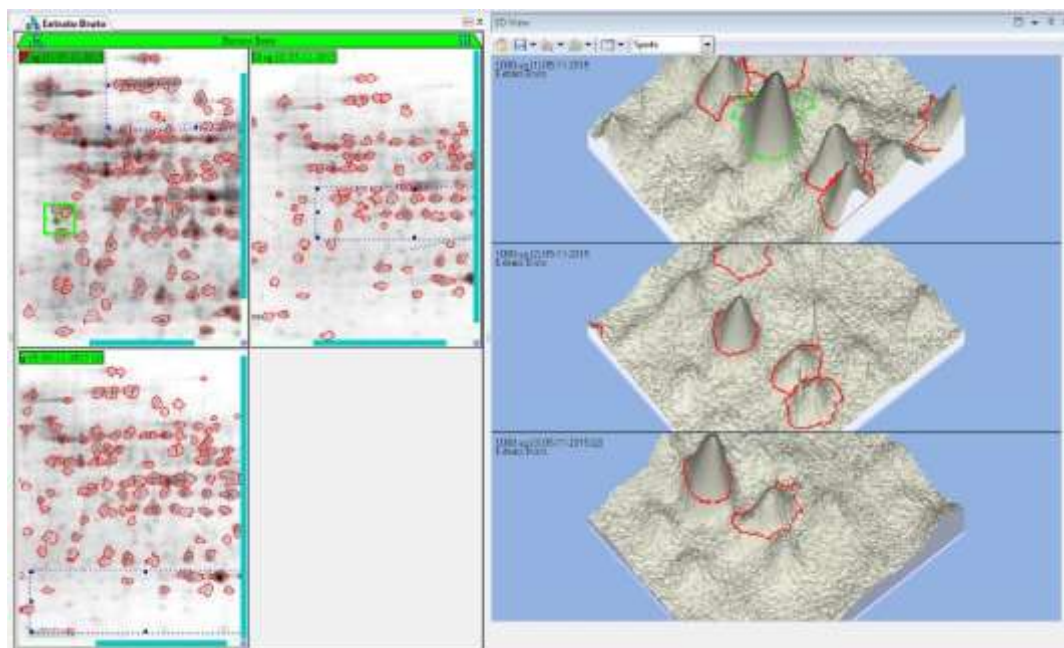


Figura 6. Géis contendo 1000 µg de proteínas e analisados no *software* Image Master 2D Platinum v 7.05. À esquerda observa-se a seleção de um spot de 43 KDa (em verde) e à direita a conformação tridimensional do mesmo spot nos três géis avaliados.

Em pesquisa realizada por Cavalheiro (2010) na caracterização de antígenos imunodominantes de *P. insidiosum*, detectou-se diversas proteínas de 15 a 120 KDa utilizando eletroforese unidimensional. As proteínas detectadas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose para realização de *western blot*. Foram testados soros de equinos, bovinos e coelhos e todos os soros reconheceram três proteínas imunodominantes: 32, 33 e 74 KDa. Em nosso trabalho, também foi notada a prevalência de proteínas com as mesmas massas moleculares observados por Cavalheiro (2010), sendo que, após análise, observou-se a frequência de 5 *spots* de 32 KDa e pontos isoelétricos 5,1 – 6,9, 11 *spots* de 33 KDa e pontos isoelétricos 5,0 – 6,6, e 2 *spots* de massa molecular de 74 KDa e pontos isoelétricos 5,8 e 5,9.

4.4. Digestão Enzimática

Dos 186 *spots* observados 103 estavam visíveis nos três géis e foram recortados, 13 deles estavam relacionados à virulência.

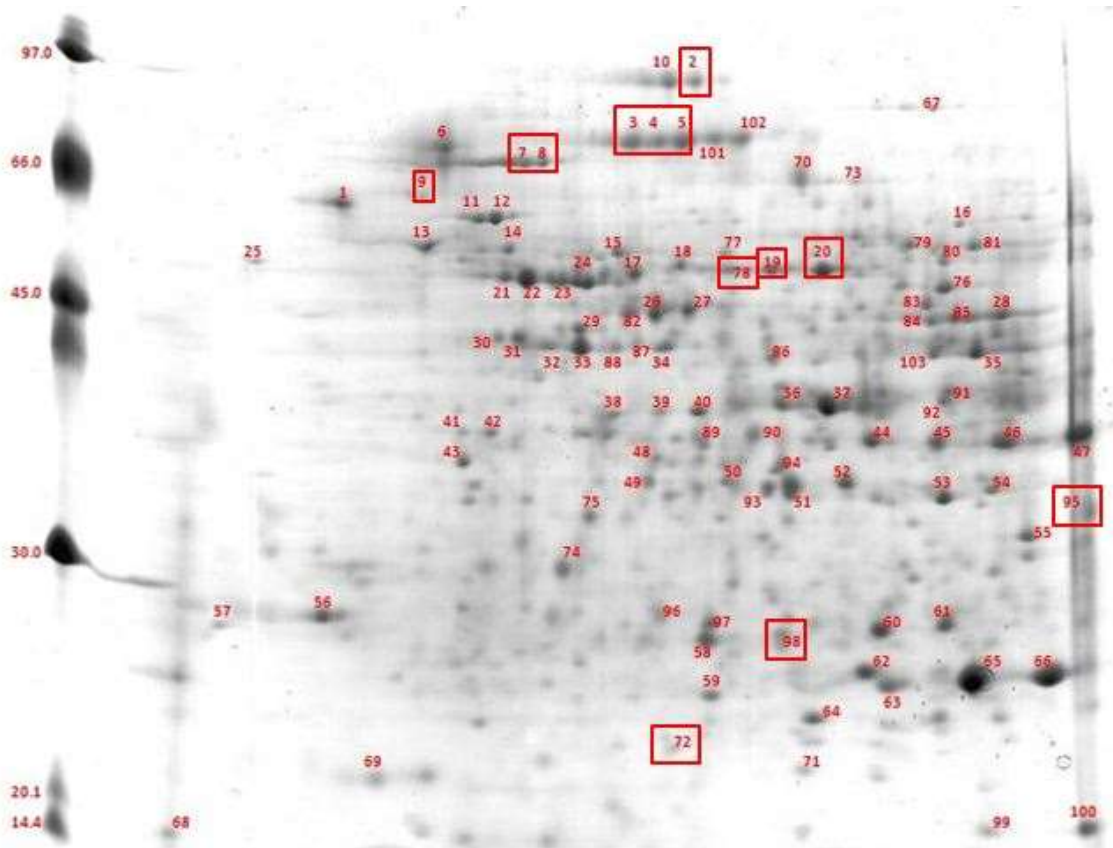


Figura 7. Gel contendo 1000 µg de proteínas, com 103 *spots* enumerados, em destaque as proteínas relacionadas à virulência.

4.5. Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas e bioinformática

O sequenciamento peptídico dos 103 *spots* resultou na identificação de 36 proteínas distintas. No **Anexo 7.1** pode ser observados os dados referentes ao número do *spot* avaliado, massa molecular, ponto isoelétrico, código de acesso ao UniProt, taxonomia (micro-organismo que revelou homologia com a proteína), função da proteína, pontuação da proteína (*Mascot score*), cobertura (em porcentagem) e sequência peptídica e *ion score*.

As proteínas sequenciadas foram agrupadas de acordo com funções relacionadas à virulência, metabolismo e respiração celular, transporte e funções nucleares, conforme ilustrado nas **Tabelas 3 a 6**.

Tabela 3. Proteínas de *Pythium insidiosum* agrupadas de acordo com as funções relacionadas à virulência.

Proteína	N° dos spots	Frequência (%)
β 1,3 glucano sintetase	2-5, 101 e 102	6,79
Hsp 70	7-9	2,91
Enolase	19, 20 e 78	2,91
Peroxirredoxina-2	72	0,97
Proteína G	95	0,97
Proteassoma unidade β	98	0,97

Tabela 4. Proteínas de *Pythium insidiosum* agrupadas de acordo com as funções relacionadas a transporte celular.

Proteína	N° dos spots	Frequência (%)
Subunidade α importina	14	0,97
Proteína actina-like	29, 33, 87 e 88	3,88
Proteína cinesina-like	34	0,97
Proteína de transmembrana	53	0,97
Proteína G	95	0,97

Tabela 5. Proteínas de *Pythium insidiosum* agrupadas de acordo com as funções relacionadas a metabolismo celular e respiração celular.

Proteína	Nº dos spots	Frequência (%)	Proteína	Nº dos spots	Frequência (%)
Desidrogenase 1	1, 21	1,94	Proteína cinesina-like	34	0,97
Próton ATPase B subunidade tipo V	15	0,97	Isocitrato desidrogenase	35,91, 92 e 103	3,88
Piruvato quinase	16, 79-82	4,85	Frutose bifostato aldolase	36-39	3,88
ATP sintase subunidade β	17, 22-27, 31, 32 e 74	9,7	Transaldolase	40-42, 49, 50, 60-62 e 89	7,76
Citrato sintase	28, 58, 76, 83-85, 96, 97	7,76	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	43-48, 54 e 90	7,76
Proteína actina-like	29, 33, 87 e 88	3,88	Carbono-nitrogênio hidrolase	51	0,97
Succinil-CoA ligase subunidade β	30	0,97	Piridoxal biossíntese PDXS liase	52, 94	1,94
14-3-3 proteína epsilon	56 e 57	1,94	Superoxido desmutase	59, 63-66 e 71	5,82
Aconitato hidratase	67	0,97	Nuceosídeo difosfato quinase	68, 69, 99, 100	3,88

Succinato desidrogenase	70, 73	1,94	Inositol-3-fosfato sintase	75	0,97
3-hidroxiisobutirato desidrogenase	77	0,97	Flavoproteína transportadora de eletóns	93	0,97
Sintase argininosuccinato	86	0,97	Proteína G	95	0,97

Tabela 6. Proteínas de *Pythium insidiosum* agrupadas de acordo com as funções relacionadas ao núcleo.

Proteína	Nº dos spots	Frequência (%)
Proteína 3 de ligação	6	0,97
Hsp 70	7-9	2,91
Chaperona	11 e 12	1,94
Subunidade α importina	14	0,97
DNA helicase	18	0,97
Proibitina	55 e 61	1,94
Proteína G	95	0,97

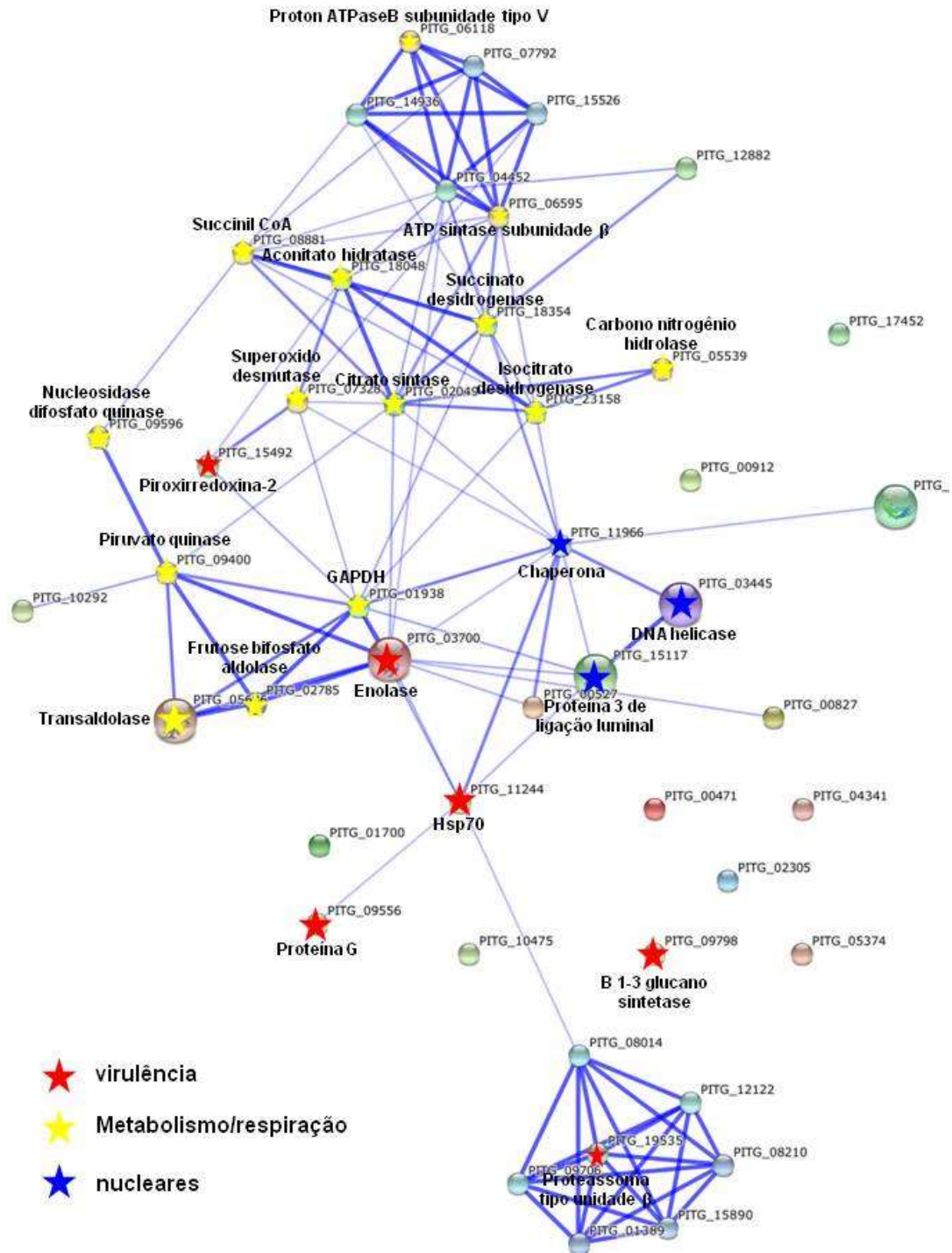


Figura 8: Rede de interação das proteínas de *Pythium insidiosum* evidenciando as proteínas de virulência e sua interação com proteínas de metabolismo e respiração celular e funções nucleares. A rede de proteínas foi analisada pelo software *String* e as associações entre as proteínas foram detectadas pela ferramenta KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). As associações proteicas mais fortes são representadas pelas linhas mais grossas.

- PITG_00471 Pyridoxal biosynthesis lyase pdxS (310 aa)
- PITG_00527 Luminal-binding protein 3 (656 aa)
- PITG_00827 Prohibitin (275 aa)
- PITG_00912 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, putative (380 aa)
- PITG_01700 Inositol-3-phosphate synthase, putative (693 aa)
- PITG_01938 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (303 aa)
- PITG_02049 Citrate synthase (471 aa)
- PITG_02305 Putative uncharacterized protein (142 aa)
- PITG_02785 Fructose-bisphosphate aldolase (390 aa)
- PITG_03445 Holliday junction ATP-dependent DNA helicase ruvB (454 aa)
- PITG_03700 Enolase (454 aa)
- PITG_04341 Transmembrane protein, putative (319 aa)
- PITG_05374 Argininosuccinate synthase (459 aa)
- PITG_05539 Carbon-nitrogen hydrolase, putative (312 aa)
- PITG_05636 Transaldolase; Transaldolase is important for the balance of metabolites in the pentose-phosphate pathway (By similarity) (334 aa)
- PITG_06118 V-type proton ATPase subunit B, putative (518 aa)
- PITG_06595 ATP synthase subunit beta; Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane (By similarity) (472 aa)
- PITG_07328 Superoxide dismutase; Destroys radicals which are normally produced within the cells and which are toxic to biological systems (By similarity) (213 aa)
- PITG_08881 Succinyl-CoA ligase beta-chain, mitochondrial (507 aa)
- PITG_09400 Pyruvate kinase (506 aa)
- PITG_09556 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like protein (317 aa)
- PITG_09596 Nucleoside diphosphate kinase (151 aa)
- PITG_09798 Glucan 1,3-beta-glucosidase, putative (694 aa)
- PITG_10292 Alcohol dehydrogenase, putative (412 aa)
- PITG_10475 Kinesin-like protein (462 aa)
- PITG_11244 Heat shock 70 kDa protein (663 aa)
- PITG_11966 Chaperonin CPN60-1, mitochondrial (597 aa)
- PITG_12882 Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (311 aa)
- PITG_15117 Actin-1; Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells (376 aa)
- PITG_15492 Peroxiredoxin-2 (198 aa)
- PITG_17452 Importin alpha-2 subunit (532 aa)
- PITG_18048 Aconitate hydratase, mitochondrial (824 aa)
- PITG_18354 Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, mitochondrial (625 aa)
- PITG_19017 14-3-3 protein epsilon (249 aa)
- PITG_19535 Proteasome subunit beta type; The proteasome is a multicatalytic proteinase complex which is characterized by its ability to cleave peptides with Arg, Phe, Tyr, Leu, and Glu adjacent to the leaving group at neutral or slightly basic pH. The proteasome has an ATP-dependent proteolytic activity (By similarity) (231 aa)
- PITG_23158 Isocitrate dehydrogenase [NADP] (422 aa)
(*Phytophthora infestans*)

São poucos os estudos a respeito de proteínas de *Pythium insidiosum* na literatura. Em 1924, Witkamp realizou os primeiros testes sorológicos visando o diagnóstico da pitiose equina. Naquela época, a doença não tinha essa denominação e tampouco se sabia que seu agente etiológico era um oomiceto. Os testes realizados naquela época foram de imunodifusão, fixação de complemento e testes intradérmicos, os quais mostraram claramente que cavalos com a infecção ativa desenvolviam uma reação de hipersensibilidade mediada por células e produção de anticorpos específicos contra antígenos purificados de *P. insidiosum*. No entanto, devido à semelhança da pitiose com outras doenças de pele em equinos, esses estudos foram rapidamente deixados de lado. Aproximadamente sessenta anos mais tarde, Miller & Campbel (1982) produziram três diferentes antígenos baseados nos dados

anteriores, e confirmaram que *P. insidiosum* expressa antígenos que estimulam a resposta imune humoral em cavalos (MENDOZA & NEWTON, 2005).

Krajaejum et al. (2006) descreveram uma proteína de 74 KDa como o antígeno imunodominante em soros de pacientes humanos com pitiose. Posteriormente, esse mesmo grupo caracterizou essa proteína por meio da espectrometria de massas e identificou dois peptídeos de 74 KDa como sendo putativo a Exo-1,3-beta-glucana de *Phytophthora infestans* (KRAJAEJUM, 2010).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de ação e virulência de *P. insidiosum*. A análise das proteínas majoritárias deste patógeno é interessante, uma vez que fornece informações quanto as proteínas presentes no micro-organismo e as funções desempenhadas por elas, favorecendo a maior compreensão de tais mecanismos.

Na **Figura 3** as proteínas estão agrupadas de acordo com as funções relacionadas à virulência. Dentre as proteínas envolvidas nesta função estão as enolases, que degradam a matriz extracelular e provocam danos nos tecidos. Observamos a presença de enolase em três *spots* proteicos, números 19, 20 e 78, com massa molecular de 49 KDa e pontos isoelétricos de 6; 6,1 e 5,8, respectivamente. Na Figura 11 observa-se que a enolase possui forte interação com as proteínas transaldolase, frutose bifosfato aldolase, gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) e piruvato quinase.

Funk et al. (2015) realizaram um estudo envolvendo a ligação da enzima enolase ao plasminogênio. Esta enzima é conhecida como um dos principais alérgenos e está envolvida no processo de invasão e disseminação durante a infecção por *Aspergillus fumigatus*. Portuondo et al. (2016) observaram uma proteína de 44 e 47 KDa em *Sporothrix scheckii* e *Sporothrix brasiliensis*, respectivamente, e constataram que a enolase possui função de adesina, facilitando sua ligação à fibronectina e laminina, glicoproteínas encontradas nas membranas celulares e que possuem a função de adesão celular.

Sardi et al. (2015) verificaram que o gene que codifica a produção de enolase, e também de outras proteínas, como a GP43, GAPDH e aspartil proteinase, estão super-expressos na produção de biofilme em *Paracoccidioides brasiliensis*. Marcos et al. (2014) relataram que a enolase possui diferentes funções em *Paracoccidioides* spp, além de participar da via

metabólica, também se liga ao plasminogênio e fibronectina, auxiliando nos processos iniciais de adesão da célula fúngica ao hospedeiro, tornando-se um importante fator de virulência.

Em *Paracoccidioides* spp., a enolase é encontrada no citoplasma e parede celular; já em *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, encontra-se na parede celular e é capaz de desencadear resposta imunológica durante a infecção a partir da adesão às células e proteínas do hospedeiro, sendo considerada importante na patogênese da candidíase (KOZIK et al., 2015).

A enolase em *Candida albicans*, encontra-se na parede celular associada às glucanas e desempenha diversas funções: permite a adesão à fibronectina e laminina da matrix extra-celular, é encontrada em meio ao biofilme, promove resposta imune humoral em pacientes com candidíase invasiva e pode ser detectada em sangue de pacientes, sendo um importante marcador para a infecção. Esta proteína também é considerada um antígeno imunodominante nessa levedura (SILVA et al., 2014). Estes autores demonstraram a importância da enolase no intestino uma vez que esta proteína intercede na colonização de *C. albicans* na mucosa intestinal.

Encontramos a enzima β 1-3 glucano sintetase em 6 spots proteicos, números 2-5, 101 e 102. Em um desses spots observou-se massa molecular de 89 KDa e ponto isoelétrico 5,4, três spots com massa molecular de 73 KDa e pontos isoelétricos 5,5, 5,6 e 5,7 e dois spots com 74 KDa e pontos isoelétricos de 5,8 e 5,9.

As glucanas são polímeros de açúcar que são compostos por unidades monossacarídicas que diferem entre si pelo tipo de ligação presente, comprimento da cadeia polissacarídica e pelas ramificações que possuem. Esses polímeros podem ser de origem vegetal, como a celulose (um tipo de β glucana), e de origem animal, como o glicogênio (um tipo de α glucana). As glucanas, tanto α quanto β , são componentes da parede celular dos fungos e sua síntese ocorre por meio de etapas que envolvem a iniciação, alongamento da cadeia e ramificação, destacando-se na etapa de alongamento a participação da enzima glucano sintase (Bauermeister et al., 2010).

A enzima β 1-3 glucano sintetase é responsável pela síntese de β glucanas presente na parede celular dos fungos, sendo esta enzima utilizada como alvo para fármacos antifúngicos, como as equinocandinas (SUCHER et

al., 2009). Alguns fungos exibem mais um tipo do que outra em sua parede, sendo a α glucana associada à maior virulência nos fungos *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Blastomyces dermatitidis* (KLEIN & TEBBETS, 2007). Em *Candida albicans*, a glucanase desempenha importante papel na morfologia do fungo (filamentação e crescimento), patogênese (adesão e invasão das hifas) e imunomodulação (SANDINI et al., 2007).

Krajaejun et al. (2006) já identificaram uma proteína de 74 KDa como sendo o antígeno imunodominante, pela técnica de *Western blotting*, em pacientes com pitiose. Em 2010 esse grupo de pesquisadores descobriram, por análise em espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF, que essa proteína de 74 KDa corresponde à enzima β 1-3 glucano sintetase. No trabalho desse grupo foram feitas duas preparações antigênicas, uma de filtrado de cultura e outra de macerado de hifas e ambas preparações submetidas ao SDS-PAGE. A banda de 74 KDa foi encontrada nas duas preparações, sendo então denominadas de s74 (filtrado de cultura) e c74 (macerado de hifas). A espectrometria de massas revelou que, apesar de terem a mesma massa molecular, são proteínas diferentes (KRAJAEJUN et al., 2010).

Na rede de interações proteicas da **Figura 10** observa-se que a proteína β 1-3 glucano sintetase não apresenta ligações com as outras proteínas aqui relacionadas à virulência. Esse fato é curioso, tendo em vista a importância da mesma já demonstrada pelos estudos de Krajaejun et al. (2010).

A proteína Peroxirredoxina-2 foi encontrada em um único *spot* proteico, número 72, com 22 KDa e ponto isoelétrico 5,7. As peroxirredoxinas (Prxs) auxiliam na defesa antioxidante, reduzindo peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e peroxinitrilo a água, álcool e nitrilo, respectivamente. Esta atividade é exercida por um resíduo de cisteína específico localizado em uma sequência conservada no N-terminal (OGUSUCU, 2009). Essa enzima desempenha papel protetor nas células, protegendo contra a oxidação prejudicial ao DNA, proteínas e lipídeos, e também de outras macromoléculas. Durante o processo inflamatório são produzidos oxigênio e nitrogênio reativos, que são tóxicos para as células, as peroxirredoxinas atuam como proteínas citoprotetoras reduzindo estas moléculas (KNOOPS et al., 2016).

As peroxirredoxinas exercem papel na modulação em reações inflamatórias. Entre as peroxirredoxinas, Prxs 2 é a mais abundante nos

neurônios de mamíferos e desempenha função protetora sob estresse oxidativo. A expressão Prxs 2 é significativamente mais elevada em cérebros de pacientes com doença de Parkinson. Parasitas nematódeos expressam níveis elevados de Prxs que desempenham papel fundamental em lidar com o estresse oxidativo. Helmintos são conhecidos por secretar uma variedade de moléculas, tais como peroxirredoxinas, proteases e citocinas que ajudam evitar o ataque do sistema imunológico do hospedeiro. Peroxirredoxinas secretada por helmintos modula a resposta imunológica de seus hospedeiros de maneira independente de sua atividade antioxidante (ISHII et al, 2012).

Bautista et al. (2013) realizaram um estudo proteômico com pacientes com pterígio, uma das alterações mais frequentes em oftalmologia. Neste estudo, a análise proteômica revelou uma super expressão da proteína peroxirredoxina 2 em comparação com análise executada com o tecido saudável dos mesmos olhos. As proteínas foram analisadas em SDS-PAGE e mostraram bandas na faixa de 20-25 KDa. Eletroforese 2D foi realizada e amostras sequenciadas identificaram a presença de Prxs 2 em níveis elevados. Os resultados sugerem que a Prxs 2 poderia proteger a célula contra a apoptose induzida por estresse oxidativo.

Entre as proteínas relacionadas à virulência, foi identificada a proteassoma unidade β em um único *spot*, número 98, com massa molecular de 26 KDa e ponto isoelétrico 6,0. Sua principal função é clivar peptídeos. Atividade proteassoma foi detectada em extratos de micélio dos fungos *Trametes versicolor* e *Phlebia radiata*, pela monitoração da clivagem de um substrato peptídico fluorogênico (7-amido-4-metil-cumarina). Um dos inibidores de proteassoma, MG132, foi usado para definir um papel para a degradação da proteassoma no metabolismo. Ação de proteassoma foi observada em culturas de *T. versicolor* e *P. radiata* após mudança nutricional de crescimento primário para idiofase desencadeada por nitrogênio e carbono. Em culturas de carbono, MG132 diminuiu a atividade peroxidase, enquanto que em cultura deficiente em nitrogênio, este inibidor de proteassoma aumentou a atividade destas enzimas em *T. versicolor* e alterações semelhantes foram observadas em *P. radiata*. Diante dos resultados as proteassomas desempenham papel no metabolismo destes organismos (STASZCZAK, M., 2002).

Djébali et al. (2009) realizaram um estudo envolvendo a patogenia de *Aphanomyces euteiches*, um oomiceto que causa a doença da podridão radicular em ervilhas, experimentalmente em modelo *Medicago truncatula* (uma planta pertencente à família Fabaceae), na obtenção do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resistência a este oomiceto. Uma linhagem susceptível e outra parcialmente resistente para *A. euteiches* foram selecionadas para análises citológicas e genéticas. A análise de microscopia de secção de raiz revelou grande diferença entre as duas linhagens. A análise genética permitiu a identificação de um sequenciamento de DNA de 135 Kb, região rica em genes relacionados com a proteassoma. A maioria destes genes demonstrou ser induzida apenas na linhagem resistente ao patógeno.

Outra proteína identificada foi a proteína G, único *spot* de número 95, com massa molecular de 32 KDa e ponto isoelétrico 6,9. Sua função está relacionada à sinalização.

Mais de 2% de todos os genes codificados pelo genoma humano são de receptores acoplados à proteína G (GPRs). Estes desempenham papel essencial em uma variedade de processos fisiológicos incluindo olfato, neurotransmissão, hormônios e enzimas liberados pelas glândulas endócrina e exócrina, respostas imunes, regulação da pressão arterial, entre outros. Alterações na sinalização GPR contribuem para muitas alterações em humanos, incluindo diabetes, doenças do sistema nervoso central, disfunção cardíaca e câncer (ZHANG et al., 2010).

Oomicetos fitopatogênicos, incluindo espécies de *Pythium* e *Phytophthora*, causam grandes perdas de rendimento para muitas plantas cultivadas, e seu controle depende fortemente de agroquímicos. Preocupações quanto aos efeitos adversos desses fungicidas na segurança alimentar e no meio ambiente, tem levado a um aumento da procura por novas estratégias, como à base de produtos naturais. Efeitos destrutivos de lipopeptídeos cíclicos (CLPs) em zoósporos de patógenos de plantas têm atraído considerável atenção. Os CLPs são produzidos por uma variedade de gêneros bacterianos incluindo *Bacillus* e *Pseudomonas*; cepas de *Pseudomonas fluorescens*, SS101, produzem nove tipos de lipopeptídeos cíclicos, sendo a massetolide A (Mass A) o principal deles. Um dos principais modos de ação natural e sintético de CLPs é a interferência com a integridade da membrana do organismo alvo,

com a formação de poros e lise celular, levando a eliminação do patógeno. Neste estudo, a proteína G foi testada na resposta celular de *Phytophthora infestans* para Mass A. Observou-se sensibilidade para Mass A em vários estágios de crescimento, sugerindo que a sinalização da proteína G desempenha papel importante na mediação da resposta celular. Uma transformação com a perda de função de *P. infestans* a partir da falta da proteína G foi mais sensível à Mass A, enquanto que a presença da mesma proteína aumentou a concentração de Mass A para interferir com a agregação de zoósporos. As respostas celulares de *P. infestans* para CLP são dependentes de sinalização da proteína G (MORTEL et al., 2009).

Em fungos as proteínas G são reguladoras-chave de processos biológicos, tais como acasalamento, virulência, morfologia, entre outros. *Mucor circinelloides*, zigomiceto patogênico, é um organismo modelo para muitos processos biológicos, e o seu genoma contém o maior repertório conhecido de genes que codificam subunidades da proteína G heterotrimétrica no reino Fungi, G α , G β e G γ . Análise filogenética revelou a multiplicidade de proteína G em *M. circinelloides*, o que poderia ser devido a requisitos específicos para responder aos sinais de sinalização durante o desenvolvimento e/ou crescimento. Além do dimorfismo, este patógeno é capaz de crescer em solos contaminados com hidrocarbonetos; também é um agente patogênico humano oportunista. Estes processos biológicos estão relacionados com as vias de sinalização controladas por subunidades de proteína G, o que sugere a possibilidade destas proteínas serem reguladoras relevantes para processos biológicos (VALLE-MALDONADO et al., 2015).

A Hsp70, proteína de choque térmico, é encontrada em todos os organismos e sua produção é aumentada durante processos químicos e térmicos de estresse. Essas proteínas são conhecidas como chaperonas moleculares e desempenham importante papel no enovelamento e transporte de proteínas. No presente estudo encontramos Hsp 70 em 3 spots, n° 7, 8 e 9, com massa molecular de 68, 68 e 62 KDa, e pontos isoelétricos de 5,2; 5,3 e 4,9, respectivamente. Em *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo dimórfico, observou-se que grandes quantidades dessa proteína são produzidas durante o processo de transição de micélio para levedura, quando a levedura é submetida ao estresse térmico a 42°C e também atua como antígeno,

desencadeando uma resposta pró-inflamatória no início da infecção (BURNIE et al., 1994, SILVA et al., 1999, THEODORO et al., 2008). Uma alta identidade foi encontrada entre as sequências do gene que codifica a Hsp 70 de *P. brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* (89,2%) sugerindo que esta proteína esteja associada a fatores de virulência em fungos patogênicos (SILVA et al., 1999).

As funções relacionadas a esta proteína, como transporte e manutenção de metabólitos celulares em condições de estresse, favorecem a sobrevivência do patógeno no organismo do hospedeiro, bem como tem sido relacionada a processos de resistência em fungos. Yoo et al. (2013) analisaram as proteínas intracelulares e de membrana em isolados de *Candida glabrata* suscetíveis, suscetíveis dose-dependente (S-DD) e resistentes ao voriconazole e constataram que a expressão dessa proteína está aumentada no meio intracelular dos isolados resistentes.

A Hsp 70 também atua como antígeno imunodominante em diversos fungos de interesse na micologia médica, como *Candida albicans*, *Aspergillus* e *Histoplasma capsulatum* (BURNIE & MATTHEWS, 1991; GOMEZ et al., 1992; EROLES et al., 1997; DEEPE & GIBBONS, 2002). Em *Cryptococcus neoformans* a Hsp 70 tem sido relatada como principal antígeno na indução de resposta imune humoral e também tem sido envolvida na adesão às células do epitélio alveolar e de macrófagos (SILVEIRA et al., 2013).

Sharafi et al. (2015) observaram elevados níveis de conservação da sequência de Hsp70 ao longo do genoma do fungo *Aspergillus* spp. Os autores concluíram que Hsp70 em fungos está envolvida no processo de resistência do micro-organismo.

Em relação à rede de interações entre as proteínas, foi proposto correlação com as proteínas identificadas neste estudo com outras proteínas relevantes do patógeno *Phytophthora infestans* no banco de dados da ontologia gênica. Dessa forma, nota-se que a enolase apresenta uma interação mais forte com as proteínas frutose bifosfato aldolase, transaldolase e gliceraldeído 3 fosfato (GAPDH), todas essas proteínas envolvidas nos processos de metabolismo e respiração celular. Observa-se uma relação indireta entre a enolase e piroxirredoxina-2, via GAPDH, e entre proteossoma e proteína G, via Hsp70. Acredita-se que essa relação indireta se deva ao fato da

proteína Hsp70 ser importante nas vias de choque térmico e estresse químico nos diferentes organismos. Pelo observado, conclui-se que a proteína Hsp70 é importante na ligação dos diferentes fatores de virulência aqui discutidos.

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**. 4ª 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.

7. ANEXOS

7.1. Dados dos spots sequenciados do *Pythium insidiosum*.

n° do spot	PM (KDa)	pI	N° acesso Uniprot	Descrição	Taxonomia	Função	Mascot Score	Cobertura (%)	Sequências peptídicas (peptide score)
1	60	4,6	ADH1_YPAST	Desidrogenase 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 204508/S288c)	Catalisa a conversão de álcoois a aldeído	741.0558	20.11	ATDGGAHGVINVSVSEAAIEAS TR(6.0167);SISIVGSYVGNR (7.1145);LPLVGGHEGAGVVVG MGENVK (5.5586); VVGLSTLPEIYEK (5.2591); VVGLSTL (0)
2	89	5,4	DONCV1	β 1,3 glucano sintetase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Sintetisa β glucana para parede celular	1382.955	6.92	WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.5927);FVIHDSFR (7.6532); WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.5927);FVIHDSFR (7.6532); QSIISMDVPQDDSHDELTDAPP APEAPTDAPTSKPK (5.528)
3	73	5,5	DONCV1	β 1,3 glucano sintetase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Sintetisa β glucana para parede celular	1228.196	7.2	WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.5698);FVIHDSFR (7.2741); WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.5698);FVIHDSFR (7.2741); LVGSSLK (5.4383)
4	73	5,6	DONEL9	β 1,3 glucano sintetase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Sintetisa β glucana para parede celular	1377.231	13.59	WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.6554);FVIHDSFR (7.4316); WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.6554);MLVGSSLKTAALCAL LALSLQPSVSSK (5.6975);VPVGDWMFNPYEPFA GCTDGAVEALDR (5.3201)
5	73	5,7	DONCV1	β 1,3 glucano sintetase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Sintetisa β glucana para parede celular	992.5881	9.51	WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.2974);FVIHDSFR (7.3811); WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.2974);FVIHDSFR (7.3811);

									HSEASMFSQDSGIFKSFKNPND TDMTCSLDTHATPFNK (5.3564)
6	72	4,9	DOMR13	Proteína 3 de ligação Luminal	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Montagem de proteínas multiméricas dentro do RE	2819.465	18.6	ITPSYVAWDSNDER (7.8735); VEIIANDQGNR (7.8299); LSQEEIDR (7.4414); SQTFFSTYQDNQPAVLIQVFEG ER (8.136); FELTGLPPAPR (6.5127)
7	68	5,2	DONGJ2	Hsp 70	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Proteína de choque térmico. Promove a produção de citocinas anti-inflamatórias, têm potencial imunorregulador	5027.155	19.76	ATAGDTHLGGEDFDNR (8.0472); TTPSYVAFTDTER (8.2169);DAGAIAGLNVL R (8.1824);SQVHEVVLVGGSTR (8.2097);TTPSYVAFTDTER (8.2169)
8	68	5,3	DONSJ5	Hsp 70	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Proteína de choque térmico. Promove a produção de citocinas anti-inflamatórias, têm potencial imunorregulador	4853.706	21.96	TTPSVVAILDNDER (8.4019); LLGNFDLVGIPPAPR (8.1079); ETSIDLSGDNLAMQR (8.2393); GVNPDEVVAMGAAIQGGVLR (8.488);GVNPDEVVAMGAAIQG GVL (8.4845)
9	62	4,9	DONGJ2	Hsp 70	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Proteína de choque térmico. Promove a produção de citocinas anti-inflamatórias, têm potencial imunorregulador	236.2333	13.57	SQVHEVVLVGGSTR (6.2561); DAGAIAGLNVL (5.535); ITITNDKGR (5.0371); GVPQIDVTFDIDANGILNVS AVE K (4.6572);NAVITVPAYFNDSQR (4.6824)
10	89	5,6	DONCV1	β 1,3 glucano sintetase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Sintetisa β glucana para parede celular	1763.312	6.92	WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.8442);FVIHDSFR (7.7545); WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.8442);FVIHDSFR (7.7545); MGAFPKNVSDYHESDGVER (5.3741)
11	58	5,1	DONHM8	Chaperona	<i>Phytophthora</i>	Enovelamento e reparo de	1184.868	14.57	VVDALNATR (7.3743);

					<i>infestans</i> (T30-4)	proteínas			SVAAGMNPTDLR (7.596); SVAAGMNPTDLR (7.6716); FGVEGR (7.0822); SVAAGMNPTDLRR (7.0464)
12	57	5,1	DONHM8	Chaperona	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Enovelamento e reparo de proteínas	1373.189	17.25	SVAAGMNPTDLR (7.6332); SVAAGMNPTDLRR (7.2528); SVAAGMNPTDLR (7.7221); APGFGDNR (7.2313); SVAAGMNPTDLRR (7.2528)
13	53	4,9	K3WIA7	Isomerase de peptidil-prolil cis-trans	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Enovelamento de proteínas	140.9229	18.66	LFTTTALLLLAAFAQAKEDLPP DAK (5.0271); NQPFDFTLGAGQVIKQWDQGE K (3.9834);SVPGDKLSMHYTGSL R (4.4652)
14	52	5,2	K3X3Z2	Subunidade α importina	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Importar macromoléculas para o interior da membrana nuclear	778.1695	10.9	VVIVALEGLENILR (7.3384); TLDADDIR (5.9042); LLSIER (5.8477);TLDADDIR (5.6721);NATWTLSNFCR (5.279)
15	52	5,5	DON6F5	Próton ATPase B subunidade tipo V	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Acidificar compartimentos intracelulares	7696.197	35.52	FIAQGPYQSR (8.4088); AVVQVFEGTDGIDNR (8.8289); QIFPPINVLPSLSR (8.3032); LALTTAEYLAYER (8.6363); HLDTYEAR (8.2494)
16	57	6,5	K3W8D3	Piruvato quinase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Converter o piruvato em acetil CoA	230.0565	16.39	MIVVLTETGTTAR (6.5508); VMGSMIGTDSILYR (6.0627); TDGIMVAR (5.8188);TDGIMVAR (5.7971);VMGSMIGTDSILYR (5.7061)
17	49	5,5	K3X5R2	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	685.4493	27.89	IPSAVGYQPTLATDLGALQER (6.4604);VGLTGLTVAEYFR (6.726);VIGQEHYDVAR (6.308); DVEGQDVLFFVDNIFR (6.5504);

18	50	5,7	K3WBQ4	DNA helicase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Promover a abertura da hélice de DNA, participa nos processos de replicação, reparação e recombinação de DNA, e transcrição de RNA	989.836	11.23	IVLEVAQHLGENTVR (6.0834); ALESTLAPIVIFATNR (7.4253); LGEIGAQTSLR (5.9556); ILAETQGR (6.0319);TEITEK (4.5959);YSVQLLTPARILAETQ GR (5.2936)
19	49	6,0	DOMYA4	Enolase	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (T30-4)	Degradar a matriz extracelular e provocar danos nos tecidos	2508.452	8.59	DVQIVGDDLTVTNPTR (8.2138); DVQIVGDDLTVTNPTR (8.2138); YNQLLR (7.6);YNQLLR (7.6); NFTEAMKIGSEVYHNLK (5.5811)
20	49	6,1	DOMYA3	Enolase	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (T30-4)	Degradar a matriz extracelular e provocar danos nos tecidos	2892.447	10.13	DVQIVGDDLTVTNPTR (8.3697); DVQIVGDDLTVTNPTR (8.3697); YNQLLR (6.8205);YNQLLR (6.8205);DVQIVGDDLTVTNPTR (6.4996)
21	48	5,1	ADH1_YPAST	Desidrogenase 1	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (ATCC 204508/S288c)	Catalisa a conversão de álcoois a aldeído	116.1925	10.34	ATDGGAHGVINVSVSEAAIEAS TR (4.6714);SISIVGSYVGNR (5.4737)
22	48	5,2	K3X5R2	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	15953.12	40.24	VGLTGLTVAEYFR (9.0802); IPSAVGYQPTLATDLGALQER (9.3482);DVEGQDVLLFVDNIFR (9.1285);AALVYGMNEPPGAR (9.0246);VIGQEHYDVAR (8.9599)
23	47	5,3	K3X5R2	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	13717.53	45.02	VGLTGLTVAEYFR (9.0894); IPSAVGYQPTLATDLGALQER (9.21);DVEGQDVLLFVDNIFR (9.0084);IVLEVAQHLGENTVR (8.8397);VIGQEHYDVAR (8.7093)

24	47	5,4	K3X5R2	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	12190.27	46.41	IPSAVGYQPTLATDLGALQER (9.0848);VGLTGLTVAEYFR (9.108);IVLEVAQHLGENTVR (8.8068);AALVYGQMNEPPGAR (8.6439);GQECVDTGNPIMVPV GPETLGR (8.4793)
25	51	4,4	K3X5R2	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	3213.074	30.48	VGLTGLTVAEYFR (8.083); TVVIMELINNVANNHGGVSVFA GVGER (8.0229); IVLEVAQHLGENTVR (7.6036); DVEGQDVLLFVDNIFR (7.9605); GSITSVQAIYVPADDLTPAPA TTFSHLDATTVLSR (7.582)
26	44	5,6	K3X5R2	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	317.9604	23.51	IVLEVAQHLGENTVR (6.0365); VGLTGLTVAEYFR (6.1619); TVVIMELINNVANNHGGVSVFA GVGER (5.6579); TVVIMELINNVANNHGGVSVFA GVGER (5.3225); DVEGQDVLLFVDNIFR (5.3835)
27	44	5,7	K3X5R2	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	145.6762	28.29	IVLEVAQHLGENTVR (5.6558); TVVIMELINNVANNHGGVSVFA GVGER (5.2408); VGLTGLTVAEYFR (5.0751); DVEGQDVLLFVDNIFR (4.9056); IMNIIGEPVDERGPINAK (4.5935)
28	44	6,7	K3WL93	Citrato sintase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a primeira reação do ciclo do ácido tricarbóxico, que regula a produção de energia mitocondrial	3992.019	16.81	LPEVAALIYR (8.3322); SLGEVTVEQTLGGAR (8.3716); VIPGYGHAVLR (8.189); NAHPMTQLSAAVTAMNTESVF AQK (5.8381); CLLWETSLLDAEEGIRFR (5.8153)

29	43	5,4	DONRP9	Proteína actina-like	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Produzir componentes vesiculares para o complexo membrana interna (IMC) durante a divisão celular	15009.85	51.86	TTGCVLDSGDGVSHTVPIYEG YALPHAIVR (8.7396);AGFAGDDAPR (8.61);SYELPDGNVIVIGNER (8.5186);AEYDESGPSIVHR (8.504);DLYCNIVLSGGTTMYP GIGER (8.5686)
30	42	5,1	K3WN63	Succinil-CoA ligase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a síntese de succinil-CoA a partir de succinato e CoA	948.5119	11.67	SILVNIFGGIMR (7.6693); SILVNIFGGIMR (7.4439); EMYFSILMDR (7.4895); EMYFSILMDR (7.2049);VFLVER (6.6236)
31	42	5,2	D0NRP9	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	3681.285	38.83	IPSAVGYQPTLATDLGALQER (5.2964);VGLTGLTVAEYFR (5.7024);IVLEVAQHLGENTVR (5.1664);VIGQEHYDVAR (5.861); DVEGQDVLLFVDNIFR (5.3621)
32	42	5,3	D0NRP9	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	19563.82	47.61	VGLTGLTVAEYFR (5.3976); VIGQEHYDVAR (5.2369); AALVYQGMNEPPGAR (4.7954); TVVIMELINNVANNHGGVSVFA GVGER (4.654); IPSAVGYQPTLATDLGALQER (4.5955)
33	41	5,4	DONRP9	Proteína actina-like	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Produzir componentes vesiculares para o complexo membrana interna (IMC) durante a divisão celular	29220.97	44.68	TTGCVLDSGDGVSHTVPIYEG YALPHAIVR (9.5059);GYSFTTTAER (9.0744);SYELPDGNVIVIGNER (9.1296);DLYCNIVLSGGTTMYP GIGER (9.154);AGFAGDDAPR (8.9359)
34	42	5,6	K3X4B7	Proteína cinesina-like	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Proteína de transporte de diversos materiais celulares de ao longo dos microtúbulos	59.8505	6.82	DNFSIVVNEAK (5.0544); DLAMVTVSSR (4.2405); AEIKELLSR (4.138);

									AANQSQLQTTR (3.4588); RITALEDNLVQK (4.0823)
35	41	6,6	D0N755	Isocitrato desidrogenase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Oxidar o NAD ⁺ em NADH + H ⁺	5445.597	15.22	TSTNPIASIWVTR (8.4573); TVEAEAAHGTVTR (8.2291); EPIVISNVPR (8.1434); CATITPDEQR (8.4012); NILNGTVFR (8.0802)
36	38	6,0	DOMX78	Frutose bifostato aldolase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Catalisar a clivagem de frutose 1,6-bifostato para formar di-hidroxiacetona e gliceraldeído 3-fostato.	6035.439	17.69	YAQEHNFPAIPAVNVTSSSTANA ALQAAR (8.5564); MNIDTDTQWAYWNGLR (8.3513); MNIDTDTQWAYWNGLR (8.5401); MNIDTDTQWAYWNGLR (8.3513); MNIDTDTQWAYWNGLR (8.5401)
37	38	6,1	D0MX78	Frutose bifostato aldolase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Catalisar a clivagem de frutose 1,6-bifostato para formar di-hidroxiacetona e gliceraldeído 3-fostato.	7469.552	7.18	YAQEHNFPAIPAVNVTSSSTANA ALQAAR (8.8793);YDPR (8.0395); VWVR (8.1758); MNIDTDTQWAYWNGLR (8.4338); MNIDTDTQWAYWNGLR (8.6758)
38	37	5,5	DOMX78	Frutose bifostato aldolase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Catalisar a clivagem de frutose 1,6-bifostato para formar di-hidroxiacetona e gliceraldeído 3-fostato.	7930.242	25.9	YAQEHNFPAIPAVNVTSSSTANA ALQAAR (8.9311); MNIDTDTQWAYWNGLR (7.503); MNIDTDTQWAYWNGLR (6.9548); VYKYAQEHNFPAIPAVNVTSSST ANAALQAAR (6.3961); SPIIIQTSNGGAIFYAGK (6.4591)
39	38	5,6	DOMX78	Frutose bifostato	<i>Phytophthora</i>	Catalisar a clivagem	7469.552	7.18	YAQEHNFPAIPAVNVTSSSTANA

				aldolase	<i>infestans</i> (T30-4)	de frutose 1,6-bifosfato para formar di-hidroxiacetona e gliceraldeído 3-fosfato.			ALQAAR (8.8905)
40	38	5,7	K3WK76	Transaldolase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Manter o equilíbrio de metabólitos na via pentose-fosfato	247.2202	5.71	IVPGYVSTEVDAR (6.0869); LAEGIR (5.8724)
41	36	5,0	K3WK76	Transaldolase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Manter o equilíbrio de metabólitos na via pentose-fosfato	322.8	8.71	IVPGYVSTEVDAR (6.4264);ILVKIASTWEGIQACK (5.2663)
42	36	5,1	K3WK76	Transaldolase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Manter o equilíbrio de metabólitos na via pentose-fosfato	424.645	20.72	IVPGYVSTEVDAR (6.5873);LAEGIR (5.8098); YKPQDATTNPSLLYK (5.1348); EATQLDQLKEFTTVVADTGDF DSIAK (5.1469);TIVMGASFR (4.3934)
43	35	5,0	K3WLI8	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em fosfato de 3-fosfo-D-glicerato	150.9797	4.12	VPTPDVSVVDLTCR (5.7432)
44	36	6,3	K3WLI8	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em fosfato de 3-fosfo-D-glicerato	4578.617	12.65	VPTPDVSVVDLTCR (8.3169); LVSWYDNEWGYSNR (8.4637); LTGMAFR (8.0078);LTGMAFR (7.3363);VIPALNGKLTGMAFR (5.6306)
45	36	6,5	K3WLI8	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em fosfato de 3-fosfo-D-glicerato	4118.087	20.59	VPTPDVSVVDLTCR (8.3051); LVSWYDNEWGYSNR (8.3084); LTGMAFR (7.8873); LTGMAFRVPTPDVSVVDLTCR (7.438);LTGMAFR (7.0119)
46	36	6,7	K3WLI8	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em fosfato de 3-fosfo-D-glicerato	1526.431	10.29	LVSWYDNEWGYSNR (7.6225); VPTPDVSVVDLTCR (7.075); LTGMAFR (6.7432);LTGMAFR (7.4265)
47	36	6,9	K3WLI8	Gliceraldeído-3-fosfato	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P)	2651.895	10.29	VPTPDVSVVDLTCR (7.78); LVSWYDNEWGYSNR (8.0349);

				desidrogenase		em fosfato de 3-fosfo-D-glicerato			LTGMAFR (6.6351);LTGMAFR (7.7295);LTGMAFRVPTPDVSV VDLTCR (6.6381)
48	35	5,6	K3WLI8	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em fosfato de 3-fosfo-D-glicerato	462.0159	10.29	LVSWYDNEWGYSNR (6.7147);LTGMAFRVPTPDVSV VDLTCR (5.1005)
49	34	5,6	K3WK76	Transaldolase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Manter o equilíbrio de metabólitos na via pentose-fosfato	329.5097	7.21	IVPGYVSTEVDAR (6.4381);LSVNFGLK (4.6643)
50	34	5,8	K3WK76	Transaldolase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Manter o equilíbrio de metabólitos na via pentose-fosfato	128.3273	3.9	IVPGYVSTEVDAR (5.6251)
51	33	6,0	DON324	Carbono-nitrogênio hidrolase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Reduzir o nitrogênio e produzir amônia	226.0224	21.15	VLLFPGAFNLTTGPAHWELLQR (5.8265);AALNEKEHPSTFALSQ LAAK (4.427);ITFKESDTLSPGNSMTLFDTPY GK (4.4324)
52	33	6,2	DOMQW5	Piridoxal biossíntese PDXS liase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Catalisar a formação de piridoxal 5'-fosfato de ribose-5-fosfato (RBP), gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e amônia	337.9684	30	GEAGTGNVVEAVR (6.4005);GGVIMDVNTVEQAR (6.9255);IAEEAGAVVMALER (5.7418);EVATTGKLPVVNFAAGGVATP ADAALMMQLGMDGVFVGSIGIF K (5.2361);IAEEAGAVVMALER (5.0948)
53	33	6,5	DON120	Proteína de membrana	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Atuam no transporte de moléculas, desempenham funções como receptoras e/ou enzimas	105.9338	14.42	ELQVVSYPFPIWIFGVLIMLGAS VVHSHVQRDDEDEKPHHVT WWK (4.8911)
54	33	6,6	K3WLI8	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em fosfato de 3-fosfo-D-glicerato	83.4591	13.53	VPTPDVSVVDLTCR (4.9843);LVSWYDNEWGYSNR (4.5806);SSIFDASSIALNDNFVK (4.4305)
55	31	6,8	DOMRS4	Proibitina	<i>Phytophthora</i>	Inibir a síntese de DNA	3597.154	17.45	IPFFQYPTILDVR

					<i>infestans</i> (T30-4)				(8.4091);AVIFDR (7.388);CLYRPNADKLSHIYAEY GPDFADR (7.1896); CLYRPNADKLSHIYAEYGPDFADR (6.2025)
56	27	4,6	DONYS2	14-3-3 proteína epsilon	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Proteínas sinalizadoras	6529.975	43.78	AVANNHNVELTVEER (8.668); DSTLIMQLLR (8.4381); DSTLIMQLLR (8.4531); YLAEFQVDDER (7.5694); LAEQAER (7.381)
57	26	4,3	DONYS2	14-3-3 proteína epsilon	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Proteínas sinalizadoras	3873.522	25.7	AVANNHNVELTVEER (8.2287); YLAEFQVDDER (8.0096); DSTLIMQLLR (6.7754); DNLTWLTSDQEPDNADANQG DMNVQDVE (6.558); DNLTWLTSDQEPDNADANQG DMNVQDVE (5.6359)
58	26	5,8	K3WL93	Citrato sintase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a primeira reação do ciclo do ácido tricarbóxico, que regula a produção de energia mitocondrial	309.5639	6.03	LPEVAALIYR (6.648); SLGEVTVEQTLGGARGVK (4.9484)
59	24	5,8	K3X9V9	Superoxido desmutase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Destruir os radicais que são normalmente produzidos no interior das células e que são tóxicos para os sistemas biológicos	248.1847	7.04	SILEVVQSATEAPVR (5.9418)
60	26	6,3	K3WK76	Transaldolase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Manter o equilíbrio de metabólitos na via pentose-fosfato	349.244	13.81	IVPGYVSTEVDAR (6.4616); VKEATQLDQLK (5.0507); LDEESAALK (5.0971); NVGEITELAGCDR (4.6803)
61	26	6,5	DOMRS4	Proibitina	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Inibir a síntese de DNA	1352.661	6.91	IPFFQYPTILDVR (7.5817); AVIFDR (6.0652)
62	24	6,3	K3WK76	Transaldolase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Manter o equilíbrio de metabólitos na via pentose-fosfato	128.8363	9.91	IVPGYVSTEVDAR (5.6); EATQLDQLK (4.593); YTGEKLSLSEK (4.2812)
63	24	6,3	K3X9V9	Superoxido	<i>Pythium ultimum</i>	Destruir os radicais que são	3712.973	32.86	SILEVVQSATEAPVR (8.2908);

				desmutase	DAOM BR144	normalmente produzidos no interior das células e que são tóxicos para os sistemas biológicos			GKSILEVVQSATEAPVR (6.5277); IEQDFGSLDQLKSEFNAASTR (5.9389);NNGGGHYNHSLFWT WMTAPGSTNTAPHGALK (5.29)
64	23	6,1	K3X9V9	Superoxido desmutase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Destruir os radicais que são normalmente produzidos no interior das células e que são tóxicos para os sistemas biológicos	161.644	7.04	SILEVVQSATEAPVR (5.5612);MSFELPK (4.1725)
65	24	6,6	K3X9V9	Superoxido desmutase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Destruir os radicais que são normalmente produzidos no interior das células e que são tóxicos para os sistemas biológicos	7615.606	40.85	SILEVVQSATEAPVR (8.907); NNGGGHYNHSLFWTWMTAPG STNTAPHGALK (6.6855); ADGSLAITSTPNQDNPLMPGV DQPLIPILGLDVWEHAYYK (6.366)
66	24	6,8	K3X9V9	Superoxido desmutase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Destruir os radicais que são normalmente produzidos no interior das células e que são tóxicos para os sistemas biológicos	2426.264	15.02	SILEVVQSATEAPVR (7.9186);HHQAYINNINNYIATD K (5.782)
67	81	6,5	K3W6K0	Aconitato hidratase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a isomerização de citrato a isocitrato via cis-aconitato	177.0903	4.06	NSIFTSYNR (6.4263); NQFTGVFDKVPVAVAR (5.84); EHAALPR (4.8522); TWGNKPLTLAEK (4.1115)
68	13	4,1	K3X7K4	Nucleosidase difosfato quinase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a troca de fostato terminal entre NDP e NTP (nucleosídeo difosfato e trifosfato)	1219.361	5.96	GDFCVEVGR (7.397)
69	20	4,7	K3X7K4	Nucleosidase difosfato quinase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a troca de fostato terminal entre NDP e NTP (nucleosídeo difosfato e trifosfato)	165.3722	5.96	GDFCVEVGR (5.6617)
70	65	6,1	K3WJE4	Succinato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Transferir elétrons de succinato para a coenzima Q	673.4579	16.49	GLFAAGEAACASVHGANR (7.1376);LGANSLDLVVFGR

									(6.3443);GEGGILR (5.9082); LFPTR (5.941); GSDWLGDQDAIHYMCR (5.8224)
71	21	6,1	K3X9V9	Superoxido desmutase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Destruir os radicais que são normalmente produzidos no interior das células e que são tóxicos para os sistemas biológicos	4919.288	7.04	SILEVVQSATEAPVR (8.5361)
72	22	5,7	DONRD5	Peroxirredoxina-2	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Proteger contra o stress oxidativo catalisando a redução de hiperóxidos	971.7693	9.09	FSHLAWINTPR (7.1786); NVDEILR (6.4773)
73	64	6,2	K3WJE4	Succinato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Transferir elétrons de succinato para a coenzima Q	795.1772	17.73	LGANSLDLLVVFGR (7.1496); GLFAAGEAACASVHGANR (7.028);AYFCTSHTCTGDGT GMALR (6.9138); GSDWLGDQDAIHYMCR (6.4511); TGHAMLHTLYGR (6.1356) VGLTGLTVAEYFR (6.3522); AALVYQGMNEPPGAR (6.1148); DVEGQDVLLFVDNIFR (5.9731); IVLEVAQHLGENTVR (5.7311); TTDNTRIVLEVAQHLGENTVR (5.2392)
74	29	5,3	K3X5R2	ATP sintase subunidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Produzir ATP a partir de ADP	342.8201	21.91	VIVLWSANTER (6.1192); QQIRDFK (4.7973);AMVLDHDLQR (4.4681);RAMVLDHDLQR (4.2582);LGVMIIVGLGGNGST LVASIIANKHHITWNTK (4.4285)
75	32	5,4	DOMTV6	Inositol-3-fosfato sintase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Sintetizar o mio-inositol pela conversão de glicose 6 fosfato em 1-mio-inositol 1-fosfato	148.1407	8.8	LPEVAALIYR (6.808); VIPGYGHAVLR (6.0561); NAHPMTQLSAAVTAMNTESVF
76	46	6,5	K3WL93	Citrato sintase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a primeira reação do ciclo do ácido tricarbóxico, que regula a produção de	406.7834	15.52	

						energia mitocondrial			AQK (5.2234); YMPEDELFRIVDTIYQVMPGVL TEHGK (5.1296)
77	52	5,8	K3WAN8	3- hidroxiisobutirato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Atuar no catabolismo do aminoácido L-vanina	84.7785	12.7	DLGLAVDCAK (5.296); ICNNLALAIQMTSVAEAMNLGV KLGVDPK (4.3366); EVAELCDTIITMLPSTAIVEHVY LGK (3.9461)
78	49	5,8	DOMYA4	Enolase	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (T30-4)	Degradar a matriz extracelular e provocar danos nos tecidos	825.4766	4.85	YNQLLR (6.9402); DVQIVGDDLTVTNPTR (7.2059); YNQLLR (6.9402); DVQIVGDDLTVTNPTR (7.2059)
79	53	6,4	K3W8D3	Piruvato quinase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Converter o piruvato em acetil CoA	2169.281	21.31	YRPSQPILVLTALGETAR (7.8659);MIVVLTETGTTAR (7.7615);VMGSMIGTDSILYR (7.6385);MIVVLTETGTTAR (7.6104);VLIVD (7.454)
80	51	6,5	K3W8D3	Piruvato quinase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Converter o piruvato em acetil CoA	341.3773	10.25	YRPSQPILVLTALGETAR (6.3532);MIVVLTETGTTAR (6.5635);ICVQAEGAIHYDELYQ ALR (5.5399);MIVVLTETGTTAR (5.8337);EVHDTYVITTADNSAV IGER (4.6139)
81	53	6,6	K3W8D3	Piruvato quinase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Converter o piruvato em acetil CoA	2843.649	22.13	YRPSQPILVLTALGETAR (8.0931);MIVVLTETGTTAR (8.1836);MIVVLTETGTTAR (7.9181);VMGSMIGTDSILYR (7.932);TDGIMVAR (7.664)
82	44	5,5	K3W8D3	Piruvato quinase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Converter o piruvato em acetil CoA	449.8399	18.65	MIVVLTETGTTAR (6.6157); MIVVLTETGTTAR (6.7408); ICVQAEGAIHYDELYQALR (6.0285);ANIAGKPVVTATQMLE SMIK (5.6513); YRPSQPILVLTALGETAR (5.3373)

83	45	6,4	K3W8D3	Citrato sintase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a primeira reação do ciclo do ácido tricarbóxico, que regula a produção de energia mitocondrial	633.9536	7.76	LPEVAALIYR (6.605); SLGEVTVEQTLGGAR (6.9304); VIPGYGHAVLR (6.2236)
84	43	6,5	K3W8D3	Citrato sintase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a primeira reação do ciclo do ácido tricarbóxico, que regula a produção de energia mitocondrial	1183.08	15.95	LPEVAALIYR (7.5703); SLGEVTVEQTLGGAR (7.1871); VIPGYGHAVLR (6.6299); AQVDGLTAEHLSRAK (5.26); NYTTLVLFVGSRAIGVLSQLFWD R (5.1209)
85	44	6,5	K3W8D3	Citrato sintase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a primeira reação do ciclo do ácido tricarbóxico, que regula a produção de energia mitocondrial	2063.734	10.99	LPEVAALIYR (7.8971); SLGEVTVEQTLGGAR (7.6733); VIPGYGHAVLR (7.64); AQVDGLTAEHLSRAK (5.441)
86	41	6,0	D0N471	Sintase argininosuccinato	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Participa do ciclo da ureia pela catálise da argininosuccinase em citrulina e aspartato	366.7801	13.94	IDIVENR (6.6133);GNVTVIGR (6.4852);TIAPWR (5.5246); VYIEDLR (5.855); MTVDPKDAPDAAEQIQVR (4.9327)
87	42	5,5	DONRP9	Proteína actina-like	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Produzir componentes vesiculares para o complexo membrana interna (IMC) durante a divisão celular	1636.039	28.72	TTGCVLDSDGDVSHTVPIYEG YALPHAIVR (7.0724);GYSFTTTAER (7.3782);AGFAGDDAPR (7.0472); TTGCVLDSDGDVSHTVPIYEG YALPHAIVR (7.0724);GYSFTTTAER (7.3782)
88	42	5,5	DONRP9	Proteína actina-like	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Produzir componentes vesiculares para o complexo membrana interna (IMC) durante a divisão celular	11751.08	39.89	TTGCVLDSDGDVSHTVPIYEG YALPHAIVR (8.6756); AEYDESGPSIVHR (8.3524); GYSFTTTAER (8.64); SYELPDGNVIVIGNER (8.4146); AGFAGDDAPR (8.2057)
89	36	5,7	K3WK76	Transaldolase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Manter o equilíbrio de metabólitos na via pentose-	2791.132	13.81	IVPGYVSTEVDAR (8.2597); LAEGIR (7.4696);TIVMGASFR

						fosfato			(6.7178);GLDASISESER (5.7544); STEPISR (4.656)
90	36	5,9	K3WL18	Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a conversão de D- gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em fosfato de 3-fosfo-D- glicerato	810.7082	14.71	VPTPDVSVVDLTCR (7.0297); LVSWYDNEWGYSNR (6.7086); SCGSNIIPSSTGAAK (5.118); LTGMAFR (6.8066)
91	39	6,5	DON755	Isocitrato desidrogenase	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (T30-4)	Oxidar o NAD ⁺ em NADH + H ⁺	168.8116	17.8	TVEAEAAHGTVTR (5.4122); TSTNPIASIWYAWTR (5.7056); CATITPDEQR (5.0399); EPIVISNVPR (4.5556); LIDDMVAQALK (4.3516)
92	38	6,5	DON755	Isocitrato desidrogenase	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (T30-4)	Oxidar o NAD ⁺ em NADH + H ⁺	440.868	11.01	TVEAEAAHGTVTR (6.1583); TSTNPIASIWYAWTR (6.5156); CATITPDEQR (6.227); EPIVISNVPR (5.182)
93	33	6,0	DONLD7	Flavoproteína transportadora de elétrons	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (T30-4)	Transferir elétrons para a cadeia respiratória mitocondrial	976.9203	15.11	LGGAVGASR (7.4781); NYLPR (6.1152);VVISGGR (6.3011);VVAPELYVAAGISGAI QHLAGMKDSK (5.3372)
94	34	6,0	DOMQW5	Piridoxal biossíntese PDXS liase	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (T30-4)	Catalisar a formação de piridoxal 5'-fosfato de ribose-5- fosfato (RBP), gliceraldeído-3- fosfato (G3P) e amônia	105.547	18.71	GGVIMDV TNVEQAR (5.6971); IAEEAGAVAVMALER (5.8086); GEAGTGNVVEAVR (5.2469); VPFVCGCR (4.8249);NLGEALRR (4.4934)
95	32	6,9	DONC99	Proteína G	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (T30-4)	Proteína de sinalização	158.6779	15.77	ENPNLLLTASR (5.6472); AVTAIATTR (5.3793); LWDLNTGITTR (4.4668); LYSLVAGDVIHALIFSPNR (4.5151)
96	27	5,6	K3WL93	Citrato sintase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a primeira reação do ciclo do ácido tricarbóxico, que regula a produção de energia mitocondrial	65.3628	2.16	LPEVAALIYR (5.2972)
97	27	5,8	K3WL93	Citrato sintase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a primeira reação do ciclo do ácido tricarbóxico,	84.5178	5.39	LPEVAALIYR (5.1245); SLGEVTVEQTLGGAR (5.1211);

						que regula a produção de energia mitocondrial			ANSAKAFSTSSGSLFEVLK (3.878)
98	26	6,0	K3XC78	Proteassoma unidade β	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Clivar peptídeos com Arg, Phe, Tyr, Leu e Glu	736.1047	15.58	GGVLMADTLGSGSLAR (6.7394); VCFYR (6.6946); VSAEGVQISEPTK (5.0995); GGVLMADTLGSGSLAR (7.3875)
99	13	6,6	K3XH7K4	Nucleosidase difosfato quinase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a troca de fostato terminal entre NDP e NTP (nucleosídeo difosfato e trifosfato)	993.4574	5.96	GDFCVEVGR (7.219)
100	13	6,9	K3XH7K4	Nucleosidase difosfato quinase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Catalisar a troca de fostato terminal entre NDP e NTP (nucleosídeo difosfato e trifosfato)	1380.397	5.96	GDFCVEVGR (7.5047)
101	74	5,8	DONCV1	β 1,3 glucano sintetase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Sintetisa β glucana para parede celular	1306.585	9.06	WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.5727); FVIHDSFR (7.5185); WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.5727); FVIHDSFR (7.5185); VPVGDWMFNPYEPFAGCTDG AVEALDR (5.3423)
102	74	5,9	DONCV1	β 1,3 glucano sintetase	<i>Phytophthora infestans</i> (T30-4)	Sintetisa β glucana para parede celular	1176.896	12.14	WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.4687); FVIHDSFR (7.4582); WTSIASTQPVGTTTTFEHWPIR (7.4687); FVIHDSFR (7.4582); CPVTSQDSFHQDDDAALTK (5.2625)
103	41	6,5	K3WXW8	Isocitrato desidrogenase	<i>Pythium ultimum</i> DAOM BR144	Oxidar o NAD ⁺ em NADH + H ⁺	489.9373	11.4	TVEAEAAHGTVTR (6.8876); VDKPVVELDGDDEMTR (4.6731); ALGIWYEHRLIDDMVAQCLK (5.0155)

