

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/08/2021.



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



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu
Departamento de Microbiologia e Imunologia

Imunoproteômica do oomiceto *Pythium insidiosum*: antígenos candidatos ao diagnóstico da pitiose equina

JÉSSICA LUANA CHECHI

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

Orientadora: Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Co-orientadora: Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Co-orientador: Dr. José Cavalcante Souza Vieira

Botucatu

2020

Jéssica Luana Chechi

**Imunoproteômica do oomiceto *Pythium insidiosum*:
antígenos candidatos ao diagnóstico da pitiose equina**

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

Orientadora: Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Co-orientadora: Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Co-orientador: Dr. José Cavalcante Souza Vieira

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cechi, Jéssica Luana.

Imunoproteômica do oomiceto *Pythium insidiosum* :
antígenos candidatos ao diagnóstico da pitiose equina /
Jéssica Cechi. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Coorientador: Lucilene Delazari dos Santos

Coorientador: José Cavalcante Souza Vieira

Capes: 21201030

1. Equino - Doenças. 2. Espectrometria de massa.
3. *Pythium*. 4. Pitiose - Diagnóstico.

Palavras-chave: Diagnóstico; Espectrometria de massas;
Imunoproteômica; Pitiose; *Pythium insidiosum*.

Dedicatória

*Aos meus pais, **Maria Rosalina de Chechi e Rubens Benedito de Chechi**,
pelo apoio e amor incondicionais em todos os
momentos de minha vida. Devo a vocês a pessoa que me tornei hoje,
seus esforços e dedicação foram essenciais para as minhas conquistas. Eu
nunca conseguiria agradecer e descrever o tamanho do meu amor.*

*Ao meu amor eterno, minha filha **Camille**,
minha fonte de motivação e determinação. A cada dia busco ser
uma pessoa melhor para servir de exemplo para você. Amor incondicional!*

Agradecimentos

*Em primeiro lugar e sempre agradecer a **Deus**, por iluminar meu caminho e minhas escolhas e me abençoar em todos os momentos da minha vida. Tudo isso é possível graças a Ele!*

*À minha orientadora **Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco** pela oportunidade dada em seu laboratório e generosa acolhida. Seus ensinamentos foram grandiosos para o meu crescimento na área da pesquisa e na vida pessoal. Obrigada por sua dedicação, respeito, paciência e orientação durante esses anos.*

*À minha co-orientadora **Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos** por me apresentar ao campo da proteômica. Obrigada por me receber em seu laboratório e por todos os ensinamentos.*

*Ao meu co-orientador **Dr. José Cavalcante Souza Vieira** por todo ensinamento compartilhado e pelo apoio. Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração e alegrias.*

*Aos amigos do laboratório, **Giselle Souza da Paz, Alana Lucena Oliveira, Ana Carolina Prado, Hans Garcia Garces, Gabriel Gasparini Camargo e Daniele Hamae Yamauchi**. Obrigada a todos pelos momentos de diversão e ajuda no dia a dia, pelas conversas e desabafos. Obrigada a cada um de vocês.*

*As minhas amigas **Fernanda C. Bérnago Alves, Marianna Janini, Daniele Vileigas, Carolina Gorgulho (Carú), Bruna Andrade, Jéssica Leite e Tarsila Franckin**. Obrigada pela amizade, pelo apoio e por compartilharem muitas vezes os momentos de dúvidas, angústias e também de alegrias.*

Vocês foram muito importantes para mim, levarei vocês sempre comigo.

*Ao **Prof. Dr. Theerapong Krajaejun** e ao **Dr. Tiwa Rotchanapreeda** pela oportunidade de realizar uma parte dessa tese no exterior, no Research Center, Mahidol University, Thailand. Serei sempre grata à carinhosa receptividade, respeito e importantes ensinamentos durante o estágio.*

*À **CAPES** e **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por todo o apoio financeiro durante esta pesquisa. (Processos nº 2016/10804-8, 2018/08009-0 e 2019/08761-7).*

À todas as pessoas que estiveram envolvidas, direta ou indiretamente, em todas as etapas de execução deste estudo, contribuindo para que o mesmo fosse realizado da melhor maneira possível.

Obrigada a todos!

Epígrafe

*“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso.
Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades.
Se estamos possuídos de uma inabalável determinação,
consequimos superá-los. Independentemente das circunstâncias,
devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”*

Dalai Lama

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. Introdução.....	11
2. Revisão de literatura.....	13
2.1. Pitiose.....	13
2.2. Epidemiologia.....	14
2.3. Patogenia.....	17
2.4. Diagnóstico e tratamento.....	18
2.5. Controle e Saúde Pública.....	22
2.6. <i>Pythium insidiosum</i> e estudos proteicos.....	22
2.7. Imunoproteômica.....	25
3. Objetivos.....	28
4. Materiais e métodos.....	28
4.1. Isolados de <i>Pythium insidiosum</i> e condições de cultivo.....	28
4.2. Extração de proteínas de <i>P. insidiosum</i>	29
4.3. Amostras de soros de equinos e humanos.....	30
4.4. Eletroforese bidimensional.....	30
4.5. 2DE immunoblotting de proteínas de <i>P. insidiosum</i>	31
4.6. Digestão enzimática e espectrometria de massas.....	32
4.7. Bioinformática.....	34
5. Referências.....	35
Artigo Científico	
Prospecting biomarkers for diagnostic and therapeutic approaches in pythiosis.....	48

Resumo

A pitiose, cujo agente etiológico é o oomiceto *Pythium insidiosum*, é uma doença emergente que ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais, afetando diversas espécies animais, sendo mais frequente em cavalos no Brasil e humanos na Tailândia. A doença é difícil de diagnosticar, porque as hifas do patógeno são frequentemente confundidas com mucormicoses ou entomofotoromicoses em cortes histológicos. Além disso, não há antígeno eficiente e específico que possa ser utilizado para o diagnóstico rápido e o tratamento eficiente da pitiose em diferentes espécies. Os antígenos são moléculas que o sistema imunológico reconhece, tornando essas moléculas importantes alvos para o diagnóstico de micro-organismos. Para a identificação de antígenos, a imunoproteômica é considerada uma ferramenta poderosa. Nesse sentido, investigamos quais antígenos de *P. insidiosum* são reconhecidos pelo soro de equinos no Brasil e por soro de pacientes tailandeses com pitiose, a fim de encontrar proteínas semelhantes que possam ser utilizadas para futuros testes de diagnóstico ou terapia para pitiose. Para identificar as proteínas imunorreativas de *P. insidiosum*, foram utilizadas abordagens imunoproteômicas, técnica de *Western blot*, seguida pela identificação de antígenos por espectrometria de massas. Consequentemente, foi possível identificar 23 antígenos reconhecidos entre os soros de equinos e humanos. Sete antígenos foram correspondentes aos soros em ambas espécies: heat shock cognate 70 KDa protein (Hsc 70), heat shock 70 KDa protein (Hsp 70), glucan 1,3-beta-glucosidase, fructose-bisphosphate aldolase, serine/threonine-protein phosphatase, aconitate hydratase e 14-3-3 protein epsilon. Portanto, esses resultados demonstram que existem antígenos de *P. insidiosum* comuns entre os soros de equinos e humanos testados que são candidatos a biomarcadores para futuros testes diagnósticos e novos candidatos à terapia da pitiose.

Palavras-chave: Diagnóstico, espectrometria de massas, imunoproteômica, pitiose, *Pythium insidiosum*.

ABSTRACT

Pythiosis, whose etiological agent is the oomycete *Pythium insidiosum*, is an life-threatening disease that occurs mainly in tropical and subtropical countries, affecting several animal species, being more frequent in horses in Brazil and humans in Thailand. The disease is difficult to diagnose, because the pathogen's hyphae are often confused with Mucorales or Entomophthorales fungi in histological sections. In addition, there is no efficient and specific antigen that can be used for the rapid diagnosis and efficient treatment of pythiosis in different species. Antigens are molecules that the immune system recognizes, making these molecules important targets for the diagnosis of microorganisms. For the identification of antigens, immunoproteomics is considered a powerful tool. In this sense, we investigated which *P. insidiosum* antigens are recognized by horses in Brazil and Thai humans' serum with pythiosis, in order to find similar proteins that could be used for future diagnostic tests or therapy approaches for pythiosis. To identify the immunoreactive proteins of *P. insidiosum*, immunoproteomic approaches were used, using the Western blot technique followed by the identification of antigens by mass spectrometry. Consequently, it was possible to identify 23 antigens recognized between the serum of horses and humans. Seven antigens were similar to the two types of serum, being heat shock cognate 70 KDa protein, heat shock 70 KDa protein, glucan 1,3-beta-glucosidase, fructose-bisphosphate aldolase, serine/threonine-protein phosphatase, aconitate hydratase and 14-3-3 protein epsilon. Therefore, these results demonstrate that there are common antigens among the different serum tested and they may be excellent candidates for putative biomarkers for future diagnosis and new approaches for pythiosis therapy.

Keywords: Diagnosis, mass spectrometry, immunoproteomics, pythiosis, *Pythium insidiosum*.

1. INTRODUÇÃO

A pitiose, doença infecciosa causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*, é uma doença emergente e com risco de vida que ocorre com mais frequência em países tropicais e subtropicais, afetando várias espécies animais, principalmente cavalos, cães e seres humanos [1-3]. *Pythium insidiosum* é um agente colonizador de plantas aquáticas, e reproduz-se assexuadamente pela produção de esporângios que, quando maduros, rompem-se e liberam zoósporos, os quais correspondem à forma infectante do patógeno. Os zoósporos se movem na água até encontrar outra planta ou animal com tecido injuriado, no qual se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a uma nova hifa, que induz ao aparecimento de lesões [3,4].

Devido à presença recorrente em regiões com acúmulo de água, o cavalo é a espécie mais afetada pela doença no mundo, sendo as lesões cutâneas as mais frequentes. Nas lesões são observadas hifas cobertas por células necróticas que formam massas branco-amareladas chamadas "*kunkers*". A forma intestinal também pode estar presente e os animais afetados apresentam episódios de cólica devido à obstrução do lúmen intestinal [5,6].

Nos seres humanos, a doença é comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, e também pode ser encontrada nas Américas e Oceania. As principais manifestações clínicas são lesões cutâneas e subcutâneas, ceratites e úlceras da córnea [7]. Outra manifestação clínica é a sistêmica ou vascular, considerada a mais grave por resultar em oclusão dos vasos [8]. No Brasil, foi descrito um único caso de pitiose humana, no estado de São Paulo, cuja fonte de infecção foi decorrente da atividade de pescaria [9,10].

A doença é difícil de diagnosticar, uma vez que as hifas do patógeno são frequentemente confundidas com fungos zigomicetos em seções histológicas e os métodos de diagnóstico utilizados na identificação de *P. insidiosum* consomem tempo, agravando o prognóstico [11-15]. Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose baseia-se na associação de manifestações clínicas, isolamento do agente em cultura [16-18], testes sorodiológicos [15,19-26] e ensaios moleculares [13,18,27-29]. O tratamento da pitiose também é difícil, pois o patógeno não responde satisfatoriamente aos antifúngicos disponíveis e é necessário realizar procedimentos cirúrgicos, muitas vezes extensos, quando possível [1,3].

Estudos envolvendo antígenos de *P. insidiosum*, provenientes de pitiose humana na Tailândia, identificaram uma proteína de 74 KDa, considerada um antígeno imunodominante [30]. Essa proteína foi identificada como β -glucanase, uma vez que apresentou homologia com proteína semelhante em *Phytophthora infestans*, oomiceto filogeneticamente próximo a *P. insidiosum* [31].

No secretoma de *P. insidiosum*, foi observada a presença abundante da proteína elicítina, ELI025, que quando analisada em testes imunohistoquímicos, mostrou 100% de sensibilidade nas seções histológicas de pitiose [14,32].

O perfil proteico de *P. insidiosum*, proveniente de isolados de pitiose equina no Brasil, detectou antígenos de diferentes massas moleculares (~ 50-55 KDa e ~ 34 KDa), quando incubados com soros de cães, coelhos, cavalos e bovinos infectados. No entanto, estas proteínas imunorreativas não foram identificadas [33].

Diante do exposto, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de identificar antígenos de *P. insidiosum*, principalmente na pitiose equina, mais

prevalente no Brasil, com potencial para utilização como biomarcador para o diagnóstico e/ou terapêutica da pitiose. Para isso, foi realizada análise imunoproteômica para selecionar as proteínas imunorreativas aos soro de equinos e humanos com pitiose.

References

1. Gastra, W.; Lipman, L.J.; De Cock, A.W.; Exel, T.K.; Pegge, R.B.; Scheurwater, J.; Vilela, R.; Mendoza, L. *Pythium insidiosum*: an overview. Vet Microbiol., v. 146, p. 1–16, 2010.
2. Krajaejun, T.; Sathapatayavongs, B.; Prachartam, R.; Nitiyanant, P.; Leelachaikul, P.; Wanachiwanawin, W.; Chaiprasert, A.; Assanasen, P.; Saipetch, M.; Mootsikapun, P.; Chetchotisakd, P.; Lekhakula, A.; Mitarnun, W.; Kalnauwakul, S.; Supparatpinyo, K.; Chaiwarith, R.; Chiewchanvit, S.; Tananuvat, N.; Srisiri, S.; Suankratay, C.; Kulwichit, W.; Wongsaisuwan, M.; Somkaew, S. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. Clin Infect Dis., v. 43, p. 569–576, 2006.
3. Mendoza, L.; Ajello, L.; McGinnis, M.R. Infection caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. J Mycol Med., v. 6, p. 151–164, 1996.
4. Mendoza, L.; Hernandez, F.; Ajello, L. Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum*. Journal of Clinical Microbiology., v.31(11), p.2967-73, 1993.
5. Reis, J.L.; Carvalho, E.C.; Nogueira, R.H.; Lemos, L.S.; Mendoza, L. Disseminated pythiosis in three horses. Veterinary Microbiology., v. 96, p. 289-295, 2003.
6. Brown, C.C.; Roberts, E.D. Intestinal pythiosis in a horse. Aust. Vet. J., v. 65(3), 1988.
7. Krajaejun, T.; Prachartam, R.; Wongwaisayawan, S.; Rochanawutinon, M.; Kunakorn, M.; Kunavisarut, S. Ocular pythiosis: is it under-diagnosed? Am J Ophthalmol., v. 137(2), p. 370-2, 2004.

8. Triscott, J.A.; Weedon, D.; Cabana, E. Human subcutaneous pythiosis. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 20, p. 267-271, 1993.
9. Bosco, S.M.G.; Bagagli, E.; Araújo Jr, J.P.; Candeias, J.M.G.; Franco, M.F.; Marques, M.E.A.; Mendoza, L.; Camargo, R.P.; Alencar Marques, S.A. Human pythiosis Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, p. 715-717, 2005.
10. Marques, S.A.; Bagagli, E.; Bosco, S.M.G.; Camargo, R.P.; Marques, M.E.A. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. *An. Bras. Dermatol.*, v.81(5), p.483 – 485, 2006.
11. Chareonsirisuthigul, T.; Khositnithikul, R.; Intaramat, A.; Inkomlue, R.; Sriwanichrak, K.; Piromsontikorn, S.; Kitiwanwanich, S.; Lowhnoo, T.; Yingyong, W.; Chaiprasert, A.; Banyong, R.; Ratanabanangkoon, K.; Brandhorst, T.T.; Krajaejun, T. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v.76, p. 42–45, 2013.
12. Intaramat, A.; Sornprachum, T.; Chanrathonkul, B.; Chaisuriya, P.; Lohnoo, T.; Yingyong, W.; Jongruja, N.; Kumsang, Y.; Sandee, A.; Chaiprasert, A.; Banyong, R.; Santurio, J.M.; Grooters, A.M.; Ratanabanangkoon, K.; Krajaejun, T. Protein A/G-based immunochromatographic test for serodiagnosis of pythiosis in human and animal subjects from Asia and Americas. *Med Mycol.*, v. 54, p. 641–647, 2016.
13. Keeratijarut, A.; Lohnoo, T.; Yingyong, W.; Rujirawat, T.; Srichunrusami, C.; Onpeaw, P.; Chongtrakool, P.; Brandhorst, T.T.; Krajaejun, T. Detection of the oomycete *Pythium insidiosum* by real-time PCR targeting the gene coding for exo-1,3- β -glucanase. *J Med Microbiol.*, v. 64, p. 971–977, 2015.
14. Inkomlue, R.; Larbcharoensub, N.; Karnsombut, P.; Lerksuthirat, T.; Aroonroch, R.; Lohnoo, T.; Yingyong, W.; Santanirand, P.; Sansopha, L.; Krajaejun, T. Development of an antielicitin antibody-based immunohistochemical assay for diagnosis of pythiosis. *J Clin Microbiol.*, v. 54, p. 43–48, 2016.
15. Krajaejun, T.; Imkhieo, S.; Intaramat, A.; Ratanabanangkoon, K. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. *Clin Vaccine Immunol.*, v. 16, p. 506–509, 2009.

16. Chaiprasert, A.; Samerpitak, K.; Wanachiwanawin, W.; Thasnakorn, P. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. *Mycoses*, v. 33, p. 317–323, 1990.
17. Mendoza, L.; Prendas, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. *Mycopathologia*, v. 104, p. 59–62, 1988.
18. Grooters, A.M.; Whittington, A.; Lopez, M.K.; Boroughs, M.N.; Roy, A.F. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues. *J Vet Diagn Invest*, v. 14, p. 288–294, 2002.
19. Krajaejun, T.; Kunakorn, M.; Niemhom, S.; Chongtrakool, P.; Prachartam, R. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. *Clin Diagn Lab Immunol.*, v. 9, p. 378–382, 2002.
20. Mendoza, L.; Kaufman, L.; Mandy, W.; Glass, R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.*, v. 4, p. 715–718, 1997.
21. Jindayok, T.; Piromsontikorn, S.; Srimuang, S.; Khupulsup, K.; Krajaejun, T. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. *Clin Vaccine Immunol.*, v. 16, p. 1047–1051, 2009.
22. Mendoza, L.; Kaufman, L.; Standard, P.G. Immunodiffusion test for diagnosing and monitoring pythiosis in horses. *J Clin Microbiol.*, v. 23, p. 813–816, 1986.
23. Prachartam, R.; Changtrakool, P.; Sathapatayavongs, B.; Jayanetra, P.; Ajello, L. Immunodiffusion test for diagnosis and monitoring of human pythiosis insidiosi. *J Clin Microbiol.*, v. 29, p. 2661–2662, 1991.
24. Keeratijarut, A.; Lohnoo, T.; Yingyong, W.; Sriwanichrak, K.; Krajaejun, T. A peptide ELISA to detect antibodies against *Pythium insidiosum* based on predicted antigenic determinants of exo-1,3- β -glucanase. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 44, p. 672–680, 2013.
25. Supabandhu, J.; Vanittanakom, P.; Laohapensang, K.; Vanittanakom, N. Application of immunoblot assay for rapid diagnosis of human pythiosis. *J Med Assoc Thai*, v. 92, p. 1063–1071, 2009.

26. Vanittanakom, N.; Supabandhu, J.; Khamwan, C.; Praparattanapan, J.; Thirach, S.; Prasertwitayakij, N.; Louthrenoo, W.; Chiewchanvit, S.; Tananuvat, N. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. J Clin Microbiol., v. 42, p. 3970–3974, 2004.
27. Keeratijarut, A.; Lohnoo, T.; Yingyong, W.; Nampoon, U.; Lerksuthirat, T.; Onpaew, P.; Chongtrakool, P.; Krajaejun, T. PCR amplification of a putative gene for exo-1,3- β -glucanase to identify the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. Asian Biomed., v. 8, p. 637–644, 2014.
28. Badenoch, P.R.; Coster, D.J.; Wetherall, B.L.; Brettig, H.T.; Rozenblds, M.A.; Drenth, A.; Wagels, G. *Pythium insidiosum* keratitis confirmed by DNA sequence analysis. Br J Ophthalmol., v. 85, p. 502–503, 2001.
29. Botton, S.A.; Pereira, D.I.; Costa, M.M.; Azevedo, M.I.; Argenta, J.S.; Jesus, F.P.K.; Alves, S.H.; Santurio, J.M. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. Curr Microbiol., v. 62, p. 1225–1229, 2011.
30. Krajaejun, T.; Kunakorn, M.; Prachartam, R.; Chongtrakool, P.; Sathapatayavongs, B.; Chaiprasert, A.; Vanittanakom, N.; Chindamporn, A.; Mootsikapun, P. 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.
31. Krajaejun, T.; Keeratijarut, A.; Sriwanichrak, K.; Lohnoo, T.; Rujirawat, T.; Petchthong, T.; Yingyong, W.; Kalambaheti, T.; Smittipat, N.; Juthayothin, T.; Sullivan, T.D. 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.
32. Lerksuthirat, T.; Lohnoo, T.; Inkomlue, R.; Rujirawat, T.; Yingyong, W.; Khositnithikul, R.; Phaonakrop, N.; Roytrakul, S.; Sullivan, T.D.; Krajaejun, T. The elicitin-like glycoprotein, ELI025, is secreted by the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* and evades host antibody responses. PLoS ONE, v. 10 (3):e0118547, 2015.
33. Dal Ben, V.; Oliveira, R.S.; Borchardt, J.L.; Valente, J.S.S.; Brasil, C.L.; Zambrano, C.G.; Leite, F.P.L.; Botton, S.A.; Pereira, D.I.B. Protein profile of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates. Medical Mycology, v. 0, p. 1 – 8, 2017.

34. Rodrigues, A.M.; Kubitschek-Barreira, P.H.; Fernandes, G.F.; de Almeida, S.R.; Lopes-Bezerra, L.M.; de Camargo, Z.P. Two-dimensional gel electrophoresis data for proteomic profiling of *Sporothrix* yeast cells. Data in Brief., v. 2, p. 32-8, 2015.
35. 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.
36. Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B.; Wildgruber, R.; Weiss, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, v. 21(6), p. 1037-53, 2000.
37. Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem., v. 68(5), p. 850-8, 1996.
38. Carvalho, P.C.; Lima, D.B.; Leprevost, F.V.; Santos, M.D.M.; Fischer, J.S.G.; Aquino, P.F.; Moresco, J.J.; Yates III, J.R.; Barbosa, V.C. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. Nature protocols, v. 11(1), p.102-117, 2016.
39. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. Nucleic Acids Research, v. 45, 2017. doi: 10.1093/nar/gkw1099.
40. Oliveros, J. C. NoVENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams Title <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
41. Szklarczyk, D; Franceschini, A.; Wyder, S.; Forslund, K.; Heller, D.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Roth, A.; Santos, A.; Tsafou, K.P.; Kuhn, M.; Bork, P.; Jensen, L.J.; von Mering, C. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Research, v. 43, 2015. doi: 10.1093/nar/gku1003.
42. Chechi, J.L.; Franckin, T.; Barbosa, L.N.; Alves, F.C.B.; Leite, A.L.; Buzalaf, M.A.R.; dos Santos, L.D.; Bosco, S.M.G. Infering putative virulence factors for *Pythium insidiosum* by proteomic approach. Medical Mycology, doi10.1093/mmy/myx166, 2018.
43. Wang, J.; Du, X. J.; Lu, X. N.; Wang, S. Immunoproteomic identification of immunogenic proteins in *Cronobacter sakazakii* strain BAA-894. Appl.Microbiol.Biotechnol., v. 97, p. 2077–2091, 2013. doi:10.1007/s00253-013-4720-5.

44. Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.*, v. 24, p.1596–9, 2007.
45. González-Aravena, M.; Calfio, C.; Mercado, L.; Morales-Lange, B.; Bethke, J.; De Lorgetil, J.; Cárdenas, C.A. HSP70 from the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*: molecular characterization and expression in response to heat stress. *Biol Res.*, v. 51:8, 2018.
46. Feder, M.E.; Hofmann, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 61, p. 243–82, 1999.
47. Kregel, K.C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, v. 92, p. 2177–2186, 2002.
48. Tiwari, S.; Thakur, R.; Shankar, J. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. *Biotechnology Research International*, Volume 2015, Article ID 132635.
49. Ohba, M. A 70-kDa heat shock cognate protein suppresses the defects caused by a proteasome mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 351, p. 263-266, 1994.
50. Bisio, L.C.; Silva, S.P.; Pereira, I.S.; Xavier, M.A.S.; Venancio, E.J.; Puccia, R.; Soares, C.M.A.; Felipe, M.S.S. A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. *Medical Mycology*, v. 43, p. 495-503, 2005.
51. Keeratijarut, A.; Lohnoo, T.; Rujirawat, T.; Yingyong, W.; Kalambaheti, T.; Miller, S.; Phuntumart, V.; Krajaejun, T. The Immunoreactive Exo-1,3-β-Glucanase from the Pathogenic Oomycete *Pythium insidiosum* Is Temperature Regulated and Exhibits Glycoside Hydrolase Activity. *PLOS ONE*, 10(8):e0135239, 2015.
52. Garfoot, A.L.; Dearing, K.L.; Vanschoiack, A.D.; Wysocki, V.H.; Rappleye, C.A. Eng1 and Exg8 Are the Major β-Glucanases Secreted by the Fungal Pathogen *Histoplasma capsulatum*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 292, p. 4801–4810, 2017.
53. Holbrook, E.D.; Edwards, J.A.; Youseff, B.H.; Rappleye, C.A. Definition of the Extracellular Proteome of Pathogenic -Phase *Histoplasma capsulatum*. *Journal Proteome Res.*, v.10, p.1929–1943, 2011.

54. Moreira, A.L.E.; Oliveira, M.A.P.; Silva, L.O.S.; Inácio, M.M.; Bailão, A.M.; Parente-Rocha, J.A.; Cruz-Leite, V.R.M.; Paccez, J.D.; Soares, C.M.A.; Weber, S.S.; Borges, C.L. Immunoproteomic Approach of Extracellular Antigens From *Paracoccidioides* Species Reveals Exclusive B-Cell Epitopes. *Journal of Proteomics*, v. 115, p. 8-22, 2015.
55. Adams, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, v.150, p. 2029–2035, 2004.
56. Smits, G.J; Van Den Ende, H. & Klis, F.M. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, v.147, p. 781–794, 2001.
57. Fontaine, T.; Hartland, R.P.; Beauvais, A.; Diaquin, M.; Latge, J.P. Purification, characterization of an endo-1,3-betaglucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Europe Journal Biochemistry*, v. 243, v. 315–321,1997.
58. Martin, K.; McDougall, B.M.; McIlroy, S.; Chen, J.; Seviour, R.J. Biochemistry and molecular biology of exo cellular fungal β -(1,3)-and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiol Rev*, v. 31, p.168–192, 2007.
59. Labe  , G.; Bezaire, J.; Groot, S.; How, C.; Rasmusson, T.; Yaeck, J.; Jervis, E.; Dmitrienko, G.I.; Guillemette, J.G. High level production of the *Magnaporthe grisea* fructose 1,6-biphosphate aldolase enzyme in *Escherichia coli* using a small volume bench-top fermentor. *Protein Expression and Purification*, v.51, p.110-119, 2007.
60. Cooper, S.J.; Leonard, G.A.; McSweeney, S.M.; Thompson, A.W.; Naismith, J.H.; Qamar, S.; Plater, A.; Berry, A.; Hunter, W.N. The crystal structure of a class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold. *Structure*, v. 4(11), p. 1303-15, 1996.
61. Labb  , G.; Groot, S.; Rasmusson, T.; Milojevic, G.; Dmitrienko, G.I.; Guillemette, J.G. Evaluation of four microbial class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase enzymes for use as biocatalysts. *Protein Expr. Purif.*, v. 80(2), p. 224-33, 2011.
62. Han, X.; Zhu, X.; Zhu, S.; Wei, L.; Hong, Z.; Guo, L.; Chen, H.; Chi, B.; Liu, Y.; Feng, L.; Ren, Y.; Wan, J. A Rational Design, Synthesis, Biological Evaluation and Structure– Activity Relationship Study of Novel Inhibitors against Cyanobacterial Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase. *J Chem Inf Model.*, v. 56(1), p. 73-81, 2016.
63. Rodaki, A.; Young, T.; Brown, A.J.P. Effects of Depleting the Essential Central Metabolic Enzyme Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase on the Growth and

Viability of *Candida albicans*: Implications for Antifungal Drug Target Discovery. Eukaryotic Cell, v.5, p. 1371–1377, 2006.

64. Tomazett, M.V.; Baeza, L.C.; Paccez, J.D.; Parente-Rocha, J.A.; Ribeiro-Dias, F.; de Almeida Soares, C.M. Identification and characterization of *Paracoccidioides lutzii* proteins interacting with macrophages. Microbes Infect., v. 21(8-9), p. 401-411, 2019.
65. Xin, H.; Dziadek, S.; Bundle, D.R.; Cutler, J.E. Synthetic glycopeptide vaccines combining β -mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. PNAS, v. 105, p.13526–13531, 2008.
66. Xin, H.; Cutler, J.E. Vaccine and Monoclonal Antibody That Enhance Mouse Resistance to Candidiasis. Clin Vaccine Immunol., v.18, p. 1656–1667, 2011.
67. Stie, J.; Bruni, G.; Fox, D. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. PLoS One, 4: e5780, 2009.
68. Chaves, E.G.; Weber, S.S.; Bao, S.N.; Pereira, L.A.; Bailao, A.M.; Borges, C.L.; Soares, C.M. Analysis of *Paracoccidioides* secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. BMC Microbiol, 15:53, 2015.
69. Dickman, M.B.; Yarden, O. Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in Filamentous Fungi. Fungal Genet Biol., v. 26(2), p. 99-117, 1999.
70. Miranda, M.N.; Masuda, C.A.; Ferreira-Pereira, A.; Carvajal, E.; Ghislain, M.; Montero-Lomelí, M. The serine/threonine protein phosphatase Sit4p activates multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res., v. 10(6), p. 674-86, 2010.
71. Leiter, É.; González, A.; Erdei, É.; Casado, C.; Kovács, L.; Ádám, C.; Oláh, J.; Miskei, M.; Molnar, M.; Farkas, I.; Hamari, Z.; Ariño, J.; Pócsi, I.; Dombrádi, V. Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi. Fungal Genet Biol., v. 49(9), p. 708-16, 2012.
72. Muszkieta, L.; Carrion, S.J.; Robinet, P.; Beau, R.; Elbim, C.; Pearlman, E.; Latgé, J.P. The protein phosphatase PhzA of *A. fumigatus* is involved in oxidative stress tolerance and fungal virulence. Fungal Genet Biol., v. 66, p. 79–85, 2014.
73. Szabó, K.; Jakab, Á.; Póliska, S.; Petrényi, K.; Kovács, K.; Issa, L.H.B.; Emri, T.; Pócsi, I.; Dombrádi, V. Deletion of the fungus specific protein phosphatase

- Z1 exaggerates the oxidative stress response in *Candida albicans*. BMC Genomics, v. 20(1):873, 2019.
74. Dantas, A.S.; Day, A.; Ikeh, M.; Kos, I.; Achan, B.; Quinn, J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. Biomolecules, v. 5(1), p. 142-65, 2015.
 75. Brito, W.A.; Rezende, T.C.V.; Parente, A.F.; Ricart, C.A.O.; Sousa, M.V.; B  o, S.N.; Soares, C.M.A. Identification, characterization and regulation studies of the aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Biol., v. 115(8), p. 697-707, 2011.
 76. Narahari, J.; Ma, R.; Wang, M.; Walden, W.E. The aconitase function of iron regulatory protein 1. Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. J Biol Chem., v. 275(21), p. 16227-34, 2000.
 77. Villafranca, J.J.; Mildvan, A.S. The mechanism of aconitase action. Detection and properties of enzyme-metal-substrate and enzyme-metal-inhibitor bridge complexes with manganese (II) and iron (II). J Biol Chem., v. 247(11), p. 3454-63, 1972.
 78. Lian, T.; Simmer, M.I.; D'Souza, C.A.; Steen, B.R.; Zuyderduyn, S.D.; Jones, S.J.; Marra, M.A.; Kronstad, J.W. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol., v. 55(5), p.1452-72, 2005.
 79. Almir  n, M.; Mart  nez, M.; Sanjuan, N.; Ugalde, R.A. Ferrochelatase is present in *Brucella abortus* and is critical for its intracellular survival and virulence. Infection and Immunity, v. 69, p. 6225-6230, 2001.
 80. Ibrahim, A. S. Host cell invasion in mucormycosis: role of iron. Curr Opin Microbiol. v. 14(4), p. 406-11, 2011.
 81. Schaible, U.E.; Kaufmann, S.H.E. Iron and microbial infection. Nat Rev Microbiol., v. 2(12), p. 946-53, 2004.
 82. Krajaejun, T.; Khositnithikul, R.; Lerksuthirat, T.; Lowhnoo, T.; Rujirawat, T.; Petchthong, T.; Yingyong, W.; Suriyaphol, P.; Smittipat, N.; Juthayothin, T.; Phuntumart, V.; Sullivan, T.D. Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. Fungal Biol., v. 115, p. 683–696, 2011.
 83. Santurio, J. M.; Zanette, R. A.; Bitencourt, P. E. R.; Alves, S. H.; Figuera, R. A.; Flores, M. M.; Wolkmer, P.; Hecktheuer, P. A.; Thomas, L. R.; Pereira, P.

- L.; Loreto, É. S. Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. *Veterinary Microbiology*, 162(2-4):826-30, 2012.
84. Lozano-Durán R. and Robatzek S.. 14-3-3 Proteins in Plant-Pathogen Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, v. 28(5), p. 511-518, 2015.
 85. Gardino, A.K.; Yaffe, M.B. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 22, p. 688-695, 2011.
 86. Obsilova, V.; Kopecka, M.; Kosek, D.; Kacirova, M.; Kylarova, S.; Rezabkova, L.; Obsil, T. Mechanisms of the 14-3-3 protein function: Regulation of protein function through conformational modulation. *Physiological Research*, v. 63, p. S155-S164, 2014.
 87. Kafle, A.; Puchadapirom, P.; Plumworasawat, S.; Dontumpchai, R.; Chan-On, W.; Buates, S.; Laha, T.; Sripa, B.; Suttiaprapa, S. Identification and characterization of protein 14-3-3 in carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Parasitol Int.*, v. 66(4), p. 426-431, 2017.
 88. Andreotti, P.F.; Monteiro da Silva, J.L.; Bailão, A.M.; Soares, C.M.; Benard, G.; Soares, C.P.; Mendes-Giannini, M.J. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.*, v. 7, p 875–881, 2005.
 89. Marcos, C.M.; Silva, J.F.; Oliveira, H.C.; Assato, P.A.; Singulani, Jde L.; Lopez, A.M.; Tamayo, D.P.; Hernandez-Ruiz, O.; McEwen, J.G.; Mendes-Giannini, M.J.; Fusco-Almeida, A.M. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. *Virulence*, v. 7, p. 72–84, 2016.
 90. Marcos, C.M.; Oliveira, H.C.; Assato, P.A.; Andrade, C.R.; Fusco-Almeida, A.M.; Mendes-Giannini, M.J.S. *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 protein is important for virulence in a murine model. *Medical Mycology*, v. 0, p. 1–5, 2018.