



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. Bérghamo 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 <i>immunoblotting</i> 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pitiose

A pitiose é uma doença infecciosa causada por um patógeno do reino Stramenopila, classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae, na qual estão inclusos os gêneros *Pythium* e *Phytophthora*. Ambos os gêneros são fitopatógenos. *Phytophthora infestans*, é o agente causador da ferrugem da batata, responsável pelo episódio da “fome da batata”, que ocorreu na Irlanda entre 1845 e 1849 [34]. São micro-organismos semelhantes a fungos encontrados em países com climas tropical e subtropical [35].

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 [1]. *Pythium insidiosum*, dentre as espécies do gênero *Pythium*, infecta humanos e animais [1,4]. No entanto, foi relatado dois casos de pitiose humana, causados pela espécie *Pythium aphanidermatum*, o que aumenta a importância deste gênero na Micologia Médica [36,37].

Pythium 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, no qual se encistam e emitem tubo

germinativo, dando origem à formação da hifa, que induz ao aparecimento das lesões [3,4]. Estudos discutem a possibilidade da penetração dos zoósporos a partir da pele íntegra, sendo atraídos pelo folículo piloso [38].

2.2. Epidemiologia

A pitiose é uma doença não transmissível de ocorrência esporádica, encontrada em regiões de clima tropical e subtropical pelo mundo. Diferentes espécies animais são afetadas pela doença, como equinos, cães, gado e pequenos ruminantes, gatos, animais selvagens e humanos [1,9,10,39-43]. No entanto, as espécies mais afetadas são equinos, cães e humanos [1].

Raça do animal, idade e sexo não são considerados determinantes da infecção. O fator mais importante a esse respeito é a permanência contínua em água com material vegetal abundante, onde os zoósporos podem penetrar na pele lesionada [4,44]. Na Tailândia, a pitiose humana tem sido fortemente associada a pacientes talassêmicos [2,45].

Historicamente, a pitiose foi primeiramente reconhecida por veterinários britânicos em cavalos da Indonésia apresentando lesões de pele, entretanto, naquele momento, a doença foi nomeada “hifomicose destruens equi” [46]. As denominações populares da pitiose são variadas, sendo conhecida em diferentes regiões por “bursatte”, “ficomicose”, “dermatite granular”, “granuloma ficomicótico”, “câncer dos pântanos” (*swamp cancer*) como é conhecida na Flórida, ou ainda “Ferida Brava” e “Ferida da Moda” na região do Pantanal Mato-grossense [1,18,44,47].

A pitiose equina é encontrada principalmente no continente americano, destacando a Região Centro-Oeste do Brasil, no Pantanal dos estados Mato

Grosso e Mato Grosso do Sul [47,48]. Devido à grande variedade e quantidade de materiais vegetais, abundância de água e altas temperaturas, o Pantanal brasileiro promove o desenvolvimento desse patógeno no meio ambiente. Durante a estação chuvosa (novembro a março), esta região observa várias áreas inundadas nas quais o gado é criado extensivamente em pastagens. Os cavalos são empregados como animais de trabalho para ajudar na remoção de gado de áreas alagadas.

Um estudo sorológico realizado em equinos no Rio Grande do Sul, do total de 1.002 soros testados pela técnica de ELISA, 11,1% (IC95% 9,23-13,22) foram soropositivos para *P. insidiosum*. Dentre as variáveis analisadas evidenciou-se maior soropositividade (74,4%) em propriedades com presença de açudes, apresentando associação de 2,13 (IC95%, 1,16-3,91) em comparação com propriedades sem açude [49]. Poucos estudos apresentam o desfecho da pitiose equina e merece destaque uma análise retrospectiva realizada por Watanabe et al. [50], na qual relata-se o atendimento clínico-cirúrgico de 28 casos de pitiose equina atendidos junto ao Serviço de Cirurgia de Grandes Animais, do Hospital Veterinário da FMVZ/Unesp de Botucatu, chamando a atenção para quanto mais distal a lesão nos membros, pior é o prognóstico para essa espécie animal [50]. Além do Brasil [47,48,51], a pitiose equina também é relatada nos Estados Unidos [52,53], Costa Rica [17], Venezuela [54], Egito [55], Índia [46] e Austrália [56,57] e, recentemente, o primeiro caso foi relatado na Tailândia [58].

A pitiose canina é relatada principalmente nos Estados Unidos [59-61] e no Brasil [62-64]. Um único caso de pitiose em cão foi relatado na Venezuela [41] e na África [43]. Em gatos a pitiose foi relatada nos Estados Unidos [65].

Em animais selvagens e aves a literatura relata sobre a ocorrência de *P. insidiosum* em dromedário [66], camelo [67], tigre de bengala [68] e dois casos em aves, um nos Estados Unidos [69] e outro no Brasil [70].

A pitiose humana foi relatada pela primeira vez na Tailândia em meados da década de 1980 [71,72]. Apesar da maioria dos casos de pitiose humana serem observadas em pacientes tailandeses, alguns casos humanos também foram relatados em outros países, como Estados Unidos [73,74], Brasil [9,10], Índia [75] e Israel [76]. Alguns casos de ceratite grave foram relatados em pacientes após nadar em regiões onde ocorre pitiose, como no Canadá [77], França [78] e Espanha [79]. Esses pacientes relataram nadar na Costa Rica, Tailândia, Brasil ou Colômbia, respectivamente.

A pitiose humana no sudeste da Ásia ocorre normalmente durante a estação chuvosa e verão, com altas frequências durante o pico de produção na lavoura de arroz, sendo a pitiose considerada uma doença ocupacional aos agricultores [80]. Como na Tailândia há muitos pântanos, adequados ao ciclo de vida de *P. insidiosum*, as pessoas que trabalham nessas áreas têm maior probabilidade de entrar em contato com o patógeno e adquirir a infecção [2].

Apesar de apresentar distribuição global, faltam estudos epidemiológicos de exposição ao *P. insidiosum* na população em geral. Neste intuito foi realizado estudo de soroprevalência em 2641 indivíduos saudáveis na Tailândia resultando na prevalência estatisticamente estimada de 0,07% (32.000 em toda a população tailandesa). O número estimado de 32.000 pessoas com anticorpos anti-*P. insidiosum* são significativos, considerando o risco em escala populacional de exposição a um patógeno que potencialmente leva à condição infecciosa de difícil diagnóstico e tratamento e com risco de vida [81].

2.3. Patogenia

Pela presença recorrente em regiões com acúmulo de água, o equino é a espécie mais acometida pela doença no mundo, principalmente na região do Pantanal mato-grossense. 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 [5,6].

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. Nas manifestações clínicas das lesões cutâneas, observa-se alopecia, lesões granulomatosas e ulcerações com presença de grande quantidade de células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos [41,82,83]. Geralmente, os cães afetados são oriundos de áreas rurais ou permaneceram por um período de tempo em locais alagados [60].

A doença pode ainda ser diagnosticada em outros animais domésticos, como em ruminantes e felinos, levando a diferentes quadros clínicos, como linfadenite e arterite [6,84,85].

No homem, a doença é comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, podendo também ser encontrada nas Américas e Oceania.

Normalmente, as lesões cutâneas e subcutâneas são de natureza granulomatosa ou lesões oculares, como ceratites e úlceras de córnea [7]. 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, muitas vezes levando à amputação de membros inferiores [8].

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 pescaria. 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 [9,10].



Figura 1. Manifestações clínicas da pitiose. (A) Pitiose cutânea/subcutânea em equino, lesão granulomatosa no membro anterior esquerdo mostrando grande edema na região afetada [86]. (B) Pitiose humana no Brasil [9]. (C) Pitiose ocular na Tailândia [87]. (D) Pitiose vascular [88].

2.4. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da pitiose é tradicionalmente baseado na associação das manifestações clínicas com isolamento do agente, exames histopatológicos, sorodiagnóstico e ensaio molecular. Para o isolamento do agente a partir de uma amostra clínica, o organismo pode ser cultivado em condições aeróbias, em meio Sabouraud dextrose, de preferência a 37 °C, e o crescimento de *P. insidiosum* é

rápido, sendo observado em menos de 24 h, colônia não aérea, submersa, coloração amarela a marrom. O isolamento do patógeno em cavalos só é possível a partir da cultura realizada com “*kunkers*”. Nas demais espécies, os tecidos infectados devem ser coletados assepticamente, lavado em solução salina ou água destilada estéreis, cortados em pequenos fragmentos e devem ser imersos em meios de cultura (Sabouraud, ágar-batata dextrose, ágar-sangue). Microscopicamente, as hifas de *P. insidiosum* são esparsamente septadas, ramificadas, amplas, assemelham-se a fungos filamentosos, como *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e zigomicetos [89].

Em cortes histológicos, observa-se que o *P. insidiosum* cora-se bem pelas técnicas de Gomori-Grocott e PAS (Periodic Acid of Schiff), no entanto devido a semelhança entre as hifas de *P. insidiosum* e fungos filamentosos mencionados acima, retarda o diagnóstico, pois frequentemente a pitiose é confundida com zigomicose [90]. Ensaio histológico com anticorpos específicos para *P. insidiosum*, anti-*P. insidiosum*, torna-se necessário.

Keeratijarut et al. [91] desenvolveram um ensaio imunoperoxidase *in house* para histodiagnóstico da pitiose, utilizando soro de coelhos infectados contra amostras de proteínas totais de *P. insidiosum*. Os resultados dos ensaios imunohistoquímicos de pitiose para 19 tecidos de pacientes mostrou 100% de sensibilidade e 94% de especificidade na detecção de *P. insidiosum* nos tecidos infectados. No entanto, foi observada reação cruzada do anti-soro de coelho com espécies de *Fusarium* [91].

Com a finalidade de melhorar a especificidade do diagnóstico, Inkomlue et al. [14] desenvolveram um ensaio imuno-histoquímico usando anti-soro de coelho contra a proteína elicítina (ELI025) de *P. insidiosum*. As elicítinas são

proteínas encontradas apenas nos oomicetos, principalmente nos gêneros *Pythium* e *Phytophthora*, e não estão presentes nos fungos. Os ensaios com anticorpo anti-ELI025 de coelho apresentou especificidade maior (100%) comparado ao estudo anterior (94%), quanto a reação cruzada com fungos [14].

Estudos utilizando amostras de soros humanos e animais na detecção de anticorpo anti-*P. insidiosum* foram analisados para o diagnóstico eficiente da pitiose. Inicialmente, foi desenvolvido um ensaio de imunodifusão (ID) usando o extrato de proteínas de *P. insidiosum* [22, 23]. No entanto, os ensaios de ID foram comprometidos devido a sensibilidade baixa, aumentando os resultados falso-negativos. Devido as desvantagens do ensaio de imunodifusão foram introduzidos ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA) [18-20], que mantem a especificidade e melhora a sensibilidade, e também análise de *Western blot*, relatando alta especificidade para a detecção de anticorpos anti-*P. insidiosum* [2,25,92]. Entretanto, para uso clínico de ELISA e *Western blot* é complicado devido ao tempo de resposta relativamente longo, procedimentos realizados em várias etapas e equipamentos indisponíveis em laboratórios de rotina. Para diagnóstico rápido e fácil da pitiose, foram desenvolvidos ensaio de hemaglutinação (HA), que fornece resultados em uma hora, utiliza glóbulos vermelhos de ovinos revestidos com proteínas de *P. insidiosum* [11,21]. Devido a detecção limitada (84-88%) e especificidade (82-99%) dos ensaios de hemaglutinação, foram realizados testes imunocromatográficos (ICA) para proporcionar eficácia e rapidez [2,91].

O uso de ensaios moleculares para detecção do patógeno se tornou popular, devido a alta eficácia do diagnóstico. A região do DNA ribossomal (rDNA; gene que contém 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA e

intergenic Spacer) é popularmente utilizada para identificar muitos microrganismos, incluindo *P. insidiosum* [93]. Em 2002, Grooters e Gee [18], desenharam dois conjuntos de *primers* (nested PCR), para identificação específica de *P. insidiosum*. No entanto, as sequências não foram amplificadas para as cepas de *P. insidiosum* da Tailândia. Vanittanakom et al. [26] desenvolveram novos conjuntos de primers e foram bem sucedidos na identificação de todas as cepas de *P. insidiosum* da Tailândia. Novos avanços foram sendo desenvolvidos para identificação deste patógeno, como o uso de diferentes genes, incluindo o gene que codifica a glucanase, e uso de plataforma de rápida amplificação (real-time PCR) [13].

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 [35,94]. O tratamento com antifúngicos convencionais é considerado pouco eficaz e sua ação contra o *P. insidiosum* é questionável. Comumente são administrados anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e compostos iodínicos, como iodeto de potássio e sódio [95]. Um estudo realizado 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 [96,97].

2.5. Controle e Saúde Pública

Não existe vacina com o objetivo de evitar novos casos de pitiose. Como mencionado anteriormente, a vacina é empregada como imunoterapia no tratamento da doença.

Em relação aos animais, é recomendável evitar a permanência destes em locais de água com vegetação, já que os zoósporos infecciosos são encontrados nesse ambiente. Entretanto, em muitas fazendas essa medida não é praticada, uma vez que a pastagem está mais disponível nessas áreas chamando atenção dos animais para alimentação. Uma boa prática para prevenir novas infecções, seria manter os animais em um ambiente mais seco.

Uma vez que é impossível interromper as práticas agrícolas, proibir a natação em rios e lagoas, a prevenção em seres humanos é também muito difícil. O uso de equipamentos de proteção individual (EPI), bem como óculos de natação, luvas, botas de borracha, para entrar em campos inundados, devem ser recomendados. Outra possibilidade é a sinalização e aconselhamento de risco em áreas endêmicas para pitiose.

A transmissão direta entre animais e humanos, transmissão zoonótica, não é relatada. A infecção é adquirida no ambiente aquático a partir da penetração de zoósporos pelo tecido injuriado. Nunca foi relatado infecção acidental em laboratório, no entanto, todo cuidado deve ser tomado ao manusear a produção de zoósporos *in vitro*.

2.6. *Pythium insidiosum* e estudos proteicos

Pesquisas desenvolvidas por um grupo da Universidade Mahidol - Tailândia, identificaram uma proteína com massa molecular de 74 KDa, a qual

vem sendo considerada como antígeno imunodominante [2]. Esta proteína foi investigada como uma β -glucanase, uma vez que apresentou homologia com proteína semelhante em *Phytophythora infestans*, oomiceto filogeneticamente próximo a *P. insidiosum* [31].

Em pesquisa realizada por Lerksuthirat et al. [32], com o secretoma do *P. insidiosum*, foi observada a presença abundante de elicítina, ELI025, 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 [32]. 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 testes diagnósticos [14].

Um estudo do perfil proteico de *P. insidiosum* detectou antígenos de diferentes massas moleculares. Foram testados soros de cães, coelhos, equinos e bovinos, e proteínas de ~ 50 - 55 KDa e ~ 34 KDa foram reconhecidas pelos soros das quatro espécies analisadas, as quais foram consideradas imunodominantes. Novos ensaios são necessários para identificação e caracterização das proteínas encontradas no estudo [33].

Um estudo recente, avaliou os espectros gerados da fragmentação de proteínas de 53 isolados de *P. insidiosum* provenientes de casos de pitiose

humana e animal nos EUA e outros países. A partir da análise foi possível identificar corretamente todos os isolados de *P. insidiosum* testados e diferenciá-los dos 18 fungos filamentosos utilizados como controle, incluindo quatro outras espécies de *Pythium* e *Phytophythium*. Os isolados de *P. insidiosum* geograficamente distintos mostraram diferenças nos espectros de proteínas. Os resultados desse estudo apontaram a técnica de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) como ferramenta para identificação rápida e precisa de *P. insidiosum* no diagnóstico da pitiose [98]. Estudo semelhante foi realizado por Krajaejun et al. [99], no qual foram analisadas por MALDI-TOF 13 cepas de *P. insidiosum* (8 humanas e 5 animais) de diferentes localizações geográficas. A partir da técnica foi possível identificar as cepas de *P. insidiosum* diferindo-as das demais espécies testadas (*Fusarium*, *Aspergillus* e espécies de fungos zigomicetos). Os espectros obtidos pela análise também foram capazes de classificar *P. insidiosum* em três grupos, Clado-I (linhagens americanas), II (linhagens asiáticas e australianas) e III (linhagens tailandesas principalmente) [99].

Krajaejun et al. [100] avaliaram o proteoma de *P. insidiosum* expostos à diferentes temperaturas (25°C e 37°C), com intuito de identificar possíveis fatores de virulência e patogenicidade. Extratos proteicos foram analisados por espectrometria de massas, resultando na identificação de 1.052 proteínas, das quais 219 foram expressas na maior temperatura e 8 foram relacionadas como putativos fatores de virulência. Os autores destacaram a importância das proteínas dependentes da temperatura e a patogênese de *P. insidiosum* [100].

Destaca-se que estudos de caracterização do *P. insidiosum* por abordagem proteômica já vêm sendo realizados em nosso laboratório. Os géis

analisados pelo *software* Image Master 2D Platinun v 7.05 (Ge Healthcare) 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, três foram classificadas como proteínas relacionadas com a virulência - β 1,3 glucano sintetase, Hsp 70 e enolase [101].

2.7. Imunoproteômica

A imunoproteômica é uma ferramenta que interroga todo repertório antigênico com finalidade de auxiliar no conhecimento e progressão de doenças, além de identificar candidatos a vacina e biomarcadores. Avanços rápidos nas abordagens genômica e proteômica resultaram na identificação e quantificação de proteínas em diversas áreas da pesquisa [103].

Em um estudo envolvendo a identificação de proteínas imunoreativas de quatro cepas do fungo *Cryptococcus gattii* (CG01, CG02, CG03 e R265), genótipo VGII, a partir das técnicas de eletroforese bidimensional, *imunoblotting* e espectrometria de massas, observou-se 38 proteínas imunodominantes nas quatro amostras. Dentre as proteínas identificadas, foram mapeados 374 peptídeos alvos potenciais de células B. As proteínas e peptídeos identificados são importantes no desenvolvimento de ferramentas de imunodiagnóstico para criptococose [104].

Abordagem imunoproteômica identificou 49 proteínas reativas em soros de pacientes com diferentes quadros de imunossupressão portadores de aspergilose invasiva causada por *Aspergillus fumigatus*. A maioria dos antígenos detectados têm papel na resposta ao estresse e metabolismo primário, sendo 18

deles novas descobertas na literatura. Os antígenos encontrados no presente estudo podem servir de base para o desenvolvimento de uma imunoterapia para aspergilose invasiva [105,106]. Gautam et al. [71] identificaram 16 proteínas provenientes de filtrado de cultura de *A. fumigatus*, a partir da técnica de *Western blotting* com soros de pacientes asmáticos sensibilizados por este fungo. Entre os alérgenos encontrados destacam-se as proteínas Asp f 2 e Asp f 13, ambas descritas como alérgenas [107].

Haro-Hernández et al. [108] analisaram as proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* com o propósito de identificar proteínas antigênicas em cepas virulentas. Foi utilizada abordagem proteômica, 2D-PAGE seguida por *Western blot*, para comparar a resposta sorológica de cepas virulentas e não-virulentas de *S. cerevisiae*. Foram identificadas 36 proteínas envolvidas na resposta ao estresse e vias metabólicas, que provocaram resposta sorológica em ratos. A seleção de proteínas como possíveis biomarcadores para infecções por *S. cerevisiae* foi avaliada em testes de soros em ratos infectados por *S. cerevisiae* contra *Candida albicans* e *Candida glabrata*. As proteínas relacionadas ao estresse, Ahp 1, Yhb 1, Oye 2, gln 1, e a proteína de ligação oxisterol Kes 1, já descritas em infecções por *C. albicans*, também foram encontradas em *S. cerevisiae*, podendo ser candidatas a biomarcadores para ensaios diagnósticos em infecções por *S. cerevisiae* [108].

Um estudo imunoproteômico realizado com soros de camundongos experimentalmente infectados por *Candida tropicalis*, resultou na identificação de 12 proteínas imunodominantes, 10 delas foram previamente relatadas como antígenos de *C. albicans*. As outras duas proteínas, Kgd2p pela primeira vez foi revelada como antigênica para espécies de *Candida*, enquanto Idh2p foi já foi

descrita como antígeno da *Candida parapsilosis*. As proteínas imunogênicas encontradas nesse estudo foram consideradas alvos para o desenvolvimento de ensaio imunodiagnóstico e vacina, além de contribuir para o conhecimento sobre a patogenicidade de *C. tropicalis* [109].

Utilizando análise imunoproteômica para *C. albicans*, Pitarch et al. [110], encontraram 87 anticorpos da classe IgG, dos quais 43 foram reconhecidas por soros controle e de pacientes com candidemia. Duas proteínas distintas, fosfoglicerato quinase e enolase, foram testadas e classificadas na diferenciação de soros de pacientes com infecção por *Candida albicans* e controle. Os autores destacam a importância desses antígenos específicos como potencial aplicação no diagnóstico ou candidatos a vacinas para candidemias [110].

Outro importante fungo estudado foi o *Sporothrix brasiliensis*, causador da esporotricose zoonótica. Castro et al. [111] 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 produzida no citoplasma [111]. Estudo similar foi desenvolvido por Rodrigues et al. [112], explorando a presença e diversidade de anticorpos específicos contra antígenos de *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* em gatos com esporotricose, analisando a eficácia destes anticorpos para sorodiagnóstico. 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 na 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 para esporotricose humana, felina e murina [112,113].

A identificação de proteínas imunodominantes também 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 [114]. 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 [115].

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 [116].

3. OBJETIVOS

Identificar e caracterizar as proteínas imunodominantes de *Pythium insidiosum* na pitiose equina e humana.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Isolados de *Pythium insidiosum* e condições de cultivo

Os isolados de *Pythium insidiosum* utilizados neste estudo, denominados “Eq-10, Eq-12, Eq-15, Eq-16 e Eq-20”, foram previamente identificados e confirmados molecularmente por sequenciamento de DNA da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal utilizando os primers ITS4-ITS5 [81]. Essas cepas são subcultivadas quinzenalmente e mantidas a 27°C no acervo do Laboratório de Micologia Médica, no departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Os fragmentos miceliais dos isolados foram transferidos para Erlenmeyers, contendo 100 mL de meio Sabouraud Dextrose Both (Difco, Detroit, EUA), e incubados sob agitação (Agitador-Incubador Orbital ES-20), 120 rpm a 37°C por cinco dias. Após esse período, caldo Sabourad foi removido, a massa micelial foi lavada com água deionizada e submetida à extração de proteínas.

4.2- Extração de proteínas de *P. insidiosum*

A extração de proteínas de *P. insidiosum* foi obtida conforme descrito por Rodrigues et al. [112], com modificações. A massa micelial foi congelada em nitrogênio líquido e macerada em gral e pistilo estéreis. O micélio macerado foi homogeneizado no instrumento Precellys 24 (Bertin Technologies) (2 ciclos de 20 segundos), em 1 mL de tampão 20mM Tris-HCl pH 8,8 contendo 2mM CaCl₂, coquetel de inibidores de protease (1:100; GE Healthcare, EUA), enzimas RNase e DNase (1:100; GE Healthcare, EUA); e *glass beads* (Sigma 425-600 µm). Então, os restos celulares e *glass beads* foram removidos por centrifugação a 14.000 x g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e acrescido

de 20mM ditionitrotol-DTT (Sigma). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad) [118] e as amostras foram mantidas a -80°C.

4.3- Amostras de soros de equinos e humanos

Amostras de soros de cavalos com pitiose foram coletadas em Botucatu, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/UNESP) e armazenadas a -20°C até o uso. Todos os cavalos tiveram a confirmação diagnóstica por isolamento de *P. insidiosum* em cultivo microbiológico. A fim de aumentar o reconhecimento de proteínas imunorreativas e evitar efeitos específicos do animal, as amostras foram analisadas em *pooled* (n = 22). Soros de equinos (n = 5) sem evidência de doenças micológicas foram utilizados como controle.

Immunoblotting também foi realizado com *pooled* (n = 10) de soros de humanos com pitiose provenientes da Tailândia. Esses pacientes tiveram o diagnóstico confirmado por identificação do agente etiológico em cultura e testes sorológicos no Hospital Ramathibodi, Departamento de Patologia, Bangkok, Tailândia. Os soros foram armazenados a -20 °C até o uso. Soros de humanos saudáveis, da Divisão de Banco de Sangue, Ramathibodi Hospital, foram utilizados como controle.

4.4- Eletroforese bidimensional

As proteínas (150 µg) foram precipitadas usando acetona 80% (1:4), após 1h30min a 4°C, e centrifugação a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C. A eluição do *pellet* foi conduzida em solução de reidratação (DeStreak, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) e 1% [v/v] de tampão de focalização isoeletrico (IEF, GE Healthcare, USA) pH 4-7, volume final de 125 µL. A focalização isoeletrica foi

realizada utilizando o sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare, EUA). As fitas IPG (pH 4-7, 7 cm) foram reidratadas durante 16h e posteriormente focalizadas em 300 V por 1h, 1000 V por 1h, 5000 V por 1h e 5000 V por 40min. Finalmente, a voltagem foi ajustada para 5000 V até 7000 Vhr (Voltage holding ratio). Todos os procedimentos de eletroforese bidimensional (2D) foram realizados a 20°C. As fitas de gradiente de pH imobilizado (IPG) foram equilibradas em 19 mM de ditiotreitol (DDT) em tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M ureia, 20% glicerol, 2% [m/v] SDS e 0,01% [m/v] azul de bromofenol) durante 15 min, seguido de 0,2 M iodoacetamida em tampão de equilíbrio durante 15 min. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida a 12,5% (m/v), selado com 0,5% de agarose e as proteínas separadas usando instrumento Tetra Mini-Protean (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA; 150 V por 15min e 200 V por 100min). Após a separação, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (50% [v/v] etanol, 5% [v/v] ácido acético) por 60 min [119] ou diretamente transferidos no caso de análise de *immunoblotting*. Os géis foram digitalizados usando o ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) calibrado no modo de transmissão.

4.5 - 2DE *immunoblotting* das proteínas de *P. insidiosum*

As proteínas de *P. insidiosum* foram separadas por eletroforese bidimensional seguida de *immunoblotting*. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,2 µm (Trans-Blot Turbo Transfer Pack; Bio-Rad, EUA) a 25 V durante 15 min usando o sistema de transferência Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, EUA). A transferência foi confirmada usando-se a coloração com Ponceau (0,15% Ponceau e 1% [v/v] ácido acético).

As membranas foram descoradas com água destilada e bloqueadas durante 16 h em tampão TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 137 mM NaCl; 0,1% [v/v] Tween 20, suplementado com 5% [m/v] leite desnatado, 1% de albumina sérica bovina, pH 7,4) a 4°C sob agitação constante. As membranas foram incubadas com anticorpo primário diluído 1:100 (*pooled* dos soros de cavalos) por 4 h a 4°C, sob agitação constante. Então, as membranas foram lavadas três vezes com tampão Tris (1 M; pH 7,5) contendo 0,05% [v/v] Tween 20 (TBST) por 5 min e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de equino conjugado com peroxidase, anticorpo produzido em coelho (Sigma, ref. A6917, EUA), diluição 1:1000 durante 2 h à temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram lavadas com TBST e a marcação foi conduzida por quimiluminescência (ImmobilonR Classico Western HRP Substrate, Merck Millipore, EUA) e analisador de imagem Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences). O *immunoblotting* com soros provenientes da Tailândia foi realizado com algumas modificações. As membranas foram incubadas com anticorpo primário diluído 1:1000 (*pooled* dos soros de pacientes) por 2 h em temperatura ambiente, sob agitação constante. Após, as membranas foram lavadas três vezes com tampão Tris (pH 7,5) contendo 0,05% [v/v] Tween 20 (TBST) por 5 min e incubadas com anticorpo secundário imunoglobulina G anti-humano conjugada com peroxidase (Bio-Rad, EUA), diluição 1:5000 por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST e a marcação foi realizada por quimiluminescência (Pierce ECL Western Blotting Substrate; Thermo Fisher, USA) e analisador de imagem ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, EUA) [30]. As imagens dos géis e das membranas foram analisadas pelo software Image Master 2D Platinum (versão 7.0, GE Healthcare, EUA).

4.6- Digestão enzimática e espectrometria de massas

Os *spots* proteicos correspondentes as proteínas imunorreativas foram excisados manualmente dos géis, descorados com etanol a 50% [v/v] e solução de ácido acético a 2,5% [v/v], desidratados com acetonitrila 100% [v/v] (gradiente grau; Merck, Alemanha) e bicarbonato de amônio 50 mM (99,5% de pureza; Sigma Chemical, Espanha) e digeridos com tripsina (Promega, Espanha) [120].

As análises dos peptídeos trípticos por espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e B, ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30µm x 5mm (Código 164649, Thermo Fisher Scientific), e dessalinizados num gradiente isocrático de 4%B por 3 minutos à um fluxo de 300 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ, 3 µm, 120 Å, 105 mm, Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP) utilizando um gradiente linear de 4-55% B por 30 min, 55% à 90% B por 1 min, mantido à 90% B por 5 minutos e reequilibrado à 4% B por 20 minutos à um fluxo de 300 nL/min. A ionização foi obtida utilizando uma fonte *Nanospray ion source* (PICOCHIP). O modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 à m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10s. Os dados de

espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, Thermo Fisher Scientific Inc.).

4.7. Bioinformática

Os dados brutos, formato.RAW, foram analisados pelo *software* PatternLab (versão 4.0.0.84 [121]) para a identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados NCBI (taxonomia *Phytophthora infestans*); enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS 40 ppm e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (Falso Discovery) máxima foi considerada de $\geq 1\%$.

As caracterizações das proteínas foram feitas utilizando o UniProt [122]. As análises comparativas dos dados foram realizadas pelo *software* Venny 2.1 [123]. A rede de interação proteína-proteína foi construída usando o banco de dados *online* STRING (<https://string-db.org>) versão 11.0. A análise da rede STRING foi realizada com nível de confiança médio (0,4) [124].

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GAASTRA, 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.; PRACHARKTAM, 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. 569-76, 2006.
3. MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infection caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Mycol Med.**, v. 6, p. 151-64, 1996.
4. MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life Cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Clin. Microbiol.**, 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. **Vet. Microbiol.**, v. 96, p. 289-95, 2003.
6. SANTURIO, J.M.; ARGENTA, J.S.; SCHWENDLER, S.E.; CAVALHEIRO, A.S.; PEREIRA, D.I.; ZANETTE, R.A.; ALVES, S.H.; DUTRA, V.; SILVA, M.C.; ARRUDA, L.P.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E.M. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Vet. Record**, v. 163, p. 276-7, 2008.
7. KRAJAEJUN, T.; PRACHARKTAM, R.; WONGWASAYAWAN, 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. **J. Cutan. Pathol.**, v. 20, p. 267-71, 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. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, p. 715-7, 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.483-5, 2006.
11. CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KHOSITNITHIKUL, R.; INTARAMAT, A.; INKOMLUE, R.; SRIWANICHRAK, K.; PIROMSONTIKORN, S.; KITIWANWANICH, S.; LOWHNOO, T.; YINGYONG, W.; CHAIPRASERT, A.; BANYONG, R.; RATANABANANGKON, 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. 42-5, 2013.
12. INTARAMAT, A.; SORNPRACHUM, T.; CHANTRATHONKUL, B.; CHAISURIYA, P.; LOHNOO, T.; YINGYONG, W.; JONGRUJA, N.; KUMSANG, Y.; SANDEE, A.; CHAIPRASERT, A.; BANYONG, R.; SANTURIO, J.M.; GROOTERS, A.M.; RATANABANANGKON, 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. 641-7, 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. 971-7, 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 anti-elicitin antibody-based immunohistochemical assay for diagnosis of pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 54, p. 43-8, 2016.
15. KRAJAEJUN, T.; IMKHIEO, S.; INTARAMAT, A.; RATANABANANGKON, K. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, p. 506-9, 2009.
16. CHAIPRASERT, A.; SAMERPITAK, K.; WANACHIWANAWIN, W.; THASNAKORN, P. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycoses**, v. 33, p. 317-23, 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. 288-94, 2002.

19. KRAJAEJUN, T.; KUNAKORN, M.; NIEMHOM, S.; CHONGTRAKOOL, P.; PRACHARKTAM, 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. 378-82, 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. 715-8, 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. 1047-51, 2009.
22. MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; STANDARD, P.G. Immunodiffusion test for diagnosing and monitoring pythiosis in horses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, p. 813-6, 1986.
23. PRACHARKTAM, R.; CHANGTRAKOOL, P.; SATHAPATAYAVONGS, B.; JAYANETRA, P.; AJELLO, L. Immunodiffusion test for diagnosis and monitoring of human pythiosis insidiosus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2661-2, 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. **South. Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 44, p. 672-80, 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. 1063-1, 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. 3970-4, 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.; ROZENBILDS, M.A.; DRENTH, A.; WAGELS, G. *Pythium insidiosum* keratitis confirmed by DNA sequence analysis. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, p. 502-3, 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. 1225-9, 2011.
30. KRAJAEJUN, T.; KUNAKORN, M.; PRACHARKTAM, R.; CHONGTRAKOOL, P.; SATHAPATAYAVONGS, B.; CHAIPRASERT, A.; VANITTANAKOM, N.; CHINDAMPORN, A.; MOOTSIPAPUN, P. Identification of a novel 74-Kilodalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44(5), p. 1674-80, 2006.
31. KRAJAEJUN, T.; KEERATIJARUT, A.; SRIWANICHRAK, K.; LOWHNOO, 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. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, p. 1203-10, 2010.
32. LERKSUTHIRAT, T.; LOHNOO, T.; INKOMLUE, R.; RUJIRAWAT, T.; YINGYONG, W.; KHOSITNITHIKUL, R.; PHAONAKROP, N.; ROYTRAKUL, S.; SULLIVAN, T.D.; KRAJAEJUN, T. The elicitor-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. **Med. Mycol.**, v. 56(4), p. 485-92, 2018.
34. RISTAINO, J.B. Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. **Microbes Infect.**, v.4, p.1369-77, 2002.
35. ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4^a ed. New York: John Wiley & sons Inc., 1996.
36. CALVANO, T.P.; BLATZ, P.J.; VENTO, T.J.; WICKES, B.L.; SUTTON, D.A.; THOMPSON, E.H.; WHITE, C.E.; RENZ, E.M.; HOSPENTHAL, D.R. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **J. Clin. Microbiol.**, v.49, p. 3710-3, 2011.
37. FARMER, A.R.; MURRAY, C.K.; DRISCOLL, I.R.; WICKES, B.L.; WIEDERHOLD, N.; SUTTON, D.A.; SANDERS, C.; MENDE, K.; ENNISS, B.; FEIG, J.; GANESAN, A.; RINI, E.A.; VENTO, T.J. Combat-related *Pythium aphanidermatum* invasive wound infection: case report and discussion of utility of molecular diagnostics. **J. Clin. Microbiol.**, v. 53(6), p. 1968-75, 2015.

38. SANTURIO, J.M.; MONTEIRO, A.B.; LEAL, A.T.; KOMMERS, G.D.; SOUSA, R.S.; CATTO, J.B. Cutaneous *Pythiosis insidiosus* in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 141, p. 123-5, 1998.
39. APPAVU, S.P.; PRAJNA, L.; RAJAPANDIAN, S.G.K. Genotyping and phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* causing human corneal ulcer. **Medical mycology**, v. 58, p. 211–218, 2020.
40. BERNHEIM, D.; DUPONT, D.; APTEL, F.; DARD, C.; CHIQUET, C.; NORMAND, A.C.; PIARROUX, R.; CORNET, M.; MAUBON, D. Pythiosis: case report leading to new features in clinical and diagnostic management of this fungal-like infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 86, p. 40–43, 2019.
41. MENDOZA, L.; ARIAS, M.; COLMENAREZ, V. & PERAZZO Y. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. **Mycopathologia**, v.159(2), p. 219-22, 2005.
42. MACHADO, G.; WEIBLEN, C.; ESCOBAR, L. E. Potential distribution of *Pythium insidiosum* in Rio Grande do Sul, Brazil, and projections to neighbour countries. **Transboundary Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 1–9, 2018.
43. RIVIERRE, C.; LAPRIE, C.; GUIARD-MARIGNY, O.; BERGEAUD, P.; BERTHELEMY, M.; GUILLOT, J. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 479–481, 2005.
44. DE COCK, A.W.; MENDOZA, L.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L.; KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **J Clin Microbiol.**, v. 25, p. 344–349, 1987.
45. SATHAPATAYAVONGS, B.; LEELACHAIKUL, P.; PRACHAKTAM, R.; ATICHARTAKARN, V.; SRIPHOJANART, S.; TRAIRATVORAKUL, P.; JIRASIRITHAM, S.; NONTASUT, S.; EURVILAICHIT, C.; FLEGEL, T. Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. **J Infect Dis.**, v. 159, p. 274–280, 1989.
46. SMITH, F. The pathology of bursattee. **Vet J.**, v. 19, p. 16–17, 1884.
47. SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; PEREIRA, D.B.; ARGENTA, J.S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 1–14, 2006.
48. SANTOS, C.E.P.; UBIALI, D.G.; PESCADOR, C.A.; ZANETTE, R.A.; SANTURIO, J.M.; MARQUES, L.C. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian Pantanal and nearby areas: results of cases. **J Eq Vet Sci**, v. 34, p. 270–274, 2014.
49. WEIBLEN, C.; MACHADO, G.; JESUS, F.P.K.; SANTURIO, J.M.; ZANETTE, R.A.; PEREIRA, D.S.B.; DIEHL, G.N.; SANTOS, L.C.; CORBELLINI, L.G.; BOTTON, S.A. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, p. 126–131, 2015.

50. WATANABE, M.J.; ALONSO, J.M.; ALVES, A.L.G.; YAMADA, A.L.M.; BOSCO, S.M.G.; RODRIGUES, C.A.; HUSSNI, C.A. Equine pythiosis: Report of 28 cases from São Paulo State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 909–916, 2015.
51. SOUTO, E.P.F.; MAIA, L.A.; OLINDA, R.G.; GALIZA, G.J.N.; KOMMERS, G.D.; MIRANDA-NETO, E.G.; DANTAS, A.F.M.; RIET-CORREA, F. Pythiosis in the nasal cavity of horses. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, p. 126–129, 2016.
52. BRIDGES, C.H.; EMMONS, C.W. A phycomycosis of horses caused by *Hyphomyces destruens*. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 138, p. 579–589, 1961.
53. WHITE, S.D.; GHODDUSI, M.; GROOTERS, A.M.; JONES, K. Cutaneous pythiosis in a nontravelled California horse. **Vet Dermatol**, v. 19, p. 391–394, 2008.
54. SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; CANELÓN, J.; PERAZZO, Y.; COLMENÁREZ, V.; LÓPEZ, J.A. Equine pythiosis: report in crossed bred (criole venezuelan) horses. **Mycopathologia**, v. 174, p. 511–517, 2012.
55. MOSBAH, E.; KARROUF, G.I.A.; YOUNIS, E.A.; SAAD, H.S.; AHDY, A.; ZAGHLOUL, A.E. Diagnosis and surgical management of pythiosis in draft horses: report of 33 cases in Egypt. **J Eq Vet Sci.**, v. 32, p. 164–169, 2012.
56. MILLER, R.I. Investigations into the biology of three ‘phycomycotic’ agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v. 81, p. 23–28, 1983.
57. SHIPTON, W.A. *Pythium destruens* sp. nov., an agent of equine pythiosis. **J Med Vet Mycol.**, v. 25, p. 137–151, 1987.
58. TONPITAK, W.; PATHOMSAKULWONG, W.; SORNKLIEN, C.; KRAJAEJUN, T.; WUTTHIWITHAYAPHONG, S. First confirmed case of nasal pythiosis in a horse in Thailand. **JMM Case Reports**, 5:e005136, 2018.
59. FISCHER, J.R.; PACE, L.W.; TURK, J.R.; KREEGER, J.M.; MILLER, M.A.; GOSSER, H.S. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **J Vet Diagn Invest.**, v. 6, p. 380–382, 1994.
60. DYKSTRA, M.J.; SHARP, N.J.; OLIVRY, T.; HILLIER, A.; MURPHY, K.M.; KAUFMAN, L.; KUNKLE, G.A.; PUCHEU-HASTON, C. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 427–33, 1999.
61. BERRYESSA, N.A.; MARKS, S.L.; PESAVENTO, P.A.; KRASNANSKY, S.K.; YOSHIMOTO, E.G.; GROOTERS, A.M. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **J Vet Intern Med.**, v. 22, p. 1065–1069, 2008.

62. TORRES-NETO, R.; BOSCO, S.M.G.; AMORIN, R.L.; BRANDÃO, C.V.; FABRIS, V.E.; ESTANISLAU, C.; BAGAGLI, E. Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil. **Vet Dermatol.**; v. 21, p. 202–204, 2010.
63. PEREIRA, D.I.B.; SCHILD, A.L.; MOTTA, M.A.; FIGHERA, R.A.; SALLIS, E.S.V.; MARCOLONGO-PEREIRA, C. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. **Vet Res Commun.**, v. 34, p. 301–306, 2010.
64. FERNANDES, C.P.M.; GIORDANI, C.; GRECCO, F.B.; SALLIS, E.S.; STAINKI, D.; GASPAR, L.F.; GARCEZ RIBEIRO, C.L.; NOBRE, M.O. Gastric pythiosis in a dog. **Rev Iberoam Micol.**; v. 29, p. 235–237, 2012.
65. RAKICH, P.M.; GROOTERS, A.M.; TANG, K.N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **J Vet Diagn Invest.**, v. 17, p. 262–269, 2005.
66. WELLEHAN, J.F.X.; FARINA, L.L.; KEOUGHAN, C.G.; LAFORTUNE, M.; GROOTERS, A.M.; MENDOZA, L.; BROWN, M.; TERRELL, S.P.; JACOBSON, E.R.; HEARD, D.J. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*), **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 35, p. 564-8, 2004.
67. VIDELA, R.; VAN AMSTEL, S.; O'NEILL, S.H.; FRANK, L.A.; NEWMAN, S.J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Med. Mycol.**, v. 50(2), p. 219-24, 2011.
68. BUERGELT, C.; POWE, J.; WHITE, T. Abdominal pythiosis in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 37(2), p.186-9, 2006.
69. PESAVENTO, P.A.; BARR, B.; RIGGS, S.M.; EIGENHEER, A.L.; PAMMA, R.; WALKER, R.L. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced Ibis. **Vet. Pathol.**, v. 45, p. 538-41, 2008.
70. SOUTO, E.P.F.; PESSOA, C.R.M.; PESSOA, A.F.A.; TROST, M.E.; KOMMERS, G.D.; CORREA, F.R.; DANTAS, A.F.M. Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio camelus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 71(3), p.1081-4, 2019.
71. THIANPRASIT, M. Fungal infection in Thailand. **Jpn J Dermatol.**, v. 96, p. 1343–1345, 1986.
72. THIANPRASIT, M. Human pythiosis. **Trop Dermatol.**, v. 4, p. 1–4, 1990.
73. SHENEP, J.L., ENGLISH, B.K.; KAUFMAN, L.; PEARSON, T.A.; THOMPSON, J.W.; KAUFMAN, R.A.; FRISCH, G.; RINALDI, M.G. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clin Infect Dis.**, v. 27, p. 1388–1393, 1998.
74. HILTON, R.E.; TEPEDINO, K.; GLENN, C.J.; MERKEL, K.L. Swamp cancer: a case of human pythiosis and review of the literature. **Br J Dermatol.**, v. 175, p. 394–397, 2016.

75. RATHI, A.; CHAKRABARTI, A.; AGARWAL, T.; PUSHKER, N.; PATIL, M.; KAMBLE, H.; TITIYAL, J.S.; MOHAN, R.; KASHYAP, S.; SHARMA, S.; SEN, S.; SATPATHY, G.; SHARMA, N. *Pythium keratitis* leading to fatal cavernous sinus thrombophlebitis. **Cornea**, v. 37, p. 518–522, 2018.
76. TANHEHCO, T.Y.; STACY, R.C.; MENDOZA, L.; DURAND, M.L.; JAKOBIEC, F.A.; COLBY, K.A. *Pythium insidiosum* keratitis in Israel. **Eye Contact Lens**, v. 37, p. 96–98, 2011.
77. HUNG, C.; LEDDIN, D. Keratitis caused by *Pythium insidiosum* in an immunosuppressed patient with Crohn's disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v.12, p. 21-2, 2014.
78. LELIEVRE, L.; BORDERIE, V.; GARCIA-HERMOSO, D.; BRIGNIER, A.C.; STERKERS, M.; CHAUMEIL, C.; LORTHOLARY, O.; LANTERNIER, F. Case Report: Imported *Pythium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 92, p. 270–273, 2015.
79. CASTELLAR, F.R.; JIMÉNEZ, C.S.; ZARZUELO, A.H.; HERRERO AMBROSIO, A.; BOTO DE LOS BUEIS, A. Intraocular minocycline for the treatment of ocular pythiosis. **Am J Health-Syst Pharm.**, v. 74, p. 821–825, 2017.
80. VANITTANAKOM, N.; SZEKELY, J.; KHANTHAWONG, S. Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 321–326, 2014.
81. LOHNOO, T.; YINGYONG, W.; KUMSANG, Y.; PAYATTIKUL, P.; JATURAPAKTRARAK, C.; CHAILURKIT, L.O.; AEKPLAKORN, W.; KRAJAEJUN, T. Seroprevalence of anti-*Pythium insidiosum* antibodies in the Thai population. **Medical Mycology**, v. 57, p. 284–290, 2019.
82. HOWERTH, E.W.; BROWN, C.C.; CROWDER, C. Subcutaneous pythiosis in a dog. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.1, p. 81-3, 1989.
83. GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **Vet. Clin. N. Am.-Small**, v. 33(4), p. 695-720, 2003.
84. MILLER, R.I.; OLCOTT, B.M.; ARCHER, M. Cutaneous pythiosis in beef calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 186, p.983-6, 1985.
85. RAKICH, P.M.; GROOTERS, A.M.; TANG, K.N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 262-9, 2005.
86. BOSCO, S.M.G.; HUSSNI, C.A.; SANTURIO, J.M.; BAGAGLI, E. (2016). Pitiose. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. (eds). **Doenças infecciosas em animais de produção e companhia**. 1st edn. Roca, Rio de Janeiro, p 946-957.
87. SUDJARITRUK, T.; SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infect. Dis.**, v.11:33, 2011.

88. PUPAIBOL, J.; CHINDAMPORN, A.; PATARAKUL, K.; SUANKRATAY, C.; SINDHUPHAK, W.; KULWICHITCORRESPONDING, W. Human pythiosis. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12(3), p. 517-8, 2006.
89. BOSCO, S.M.G.; CHECHI, J.L.; PAZ, G.S.; KRAJAEJUN, T. (2019). Pythiosis. K. Singh, N. Srivastava (eds.). **Recent Trends in Human and Animal Mycology**. Springer Nature Singapore Pte Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9435-5_1
90. KAUFFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycopathologia**, v.143, p.3-7, 1998.
91. KEERATIJARUT, A.; KARNSOMBUT, P.; AROONROCH, R.; SRIMUANG, S.; SANGRUCHI, T.; SANSOPHA, L.; MOOTSIKAPUN, P.; LARBCHAROENSUB, N.; KRAJAEJUN, T. Evaluation of an in-house immunoperoxidase staining assay for histodiagnosis of human pythiosis. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 40, p. 1298–1305, 2009.
92. MENDOZA, L.; NICHOLSON, V.; PRESCOTT, J.F. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 2980–2983, 1992.
93. KRAJAEJUN, T.; SATHAPATAYAVONGS, B.; SULLIVAN, T.D. (2011) *Pythium*. In: Liu D (ed) **Molecular detection of human fungal pathogens**, 1st edn. CRC press, Florida, pp 851–863.
94. GRIFFITH, J.M.; DAVIS, A.J.; GRANT, B.R. Target sites of fungicides to control oomycetes. In: Target sites for fungicidal action. Eds.W. Köller. CRC, Boca Raton, FL. Pp. 69-100, 1992.
95. SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica. 1ª ed., Porto Alegre: UFRGS editora, 2003. 111p.
96. McMULLAN, W. C.; JOYCE, J.R.; HANSELKA, D.V.; HEITMANN, J.M. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 170, p. 1293-7, 1977.
97. DÓRIA, R.G.; FREITAS, S.H.; LINARDI, R.L.; MENDONÇA, F.DE S.; ARRUDA, L.P.; BOABAID, F.M.; VALADÃO, C.A. Treatment of pythiosis in equine limbs using intravenous regional perfusion of amphotericin B. **Vet. Surg.**, v.41(6), p. 759-65, 2012.
98. MANI, R.; VILELA, R.; KETTLER, N.; CHILVERS, M.I.; MENDOZA, L. Identification of *Pythium insidiosum* complex by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J. Med. Microbiol.**, v. 68(4), p. 574-84, 2019.
99. KRAJAEJUN, T.; LOHNOO, T.; JITTORNTAM, P.; SRIMONGKOL, A.; KUMSANG, Y.; YINGYONG, W.; RUJIRAWAT, T.; REAMTONG, O.; MANGMEE, S. Assessment of matrix-assisted laser desorption ionization-

time of flight mass spectrometry for identification and biotyping of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 77, p. 61-7, 2018.

100. KRAJAEJUN, T.; REAMTONG, O.; LOHNOO, T.; YINGYONG, W.; THAMMASUDJARIT, R. Assessment of temperature-dependent proteomes of *Pythium insidiosum* by using the SWISS-PROT database. **Med. Mycol.**, v. 57(7), p. 918-21, 2019.
101. CHECHI, J.L.; FRANCKIN, T.; BARBOSA, L.N.; ALVES, F.C.B.; LEITE, A.L.; BUZALAF, M.A.R.; DELAZARI DOS SANTOS, L.; BOSCO, S.M.G. Inferring putative virulence factors for *Pythium insidiosum* by proteomic approach. **Med. Mycol.**, v. 57(1), p. 92-100, 2019.
102. SCHURCKO, A.; MENDOZA, L.; DE COCK, A.W.; KLASSEN, G.R. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and Americas are explored. **Mycology**, v. 95, p. 200-8, 2003.
103. FULTON, K.M.; TWINE, S.M. (eds.), **Immunoproteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, 25-58, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9597-4_2, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2019.
104. MARTINS, L.M.S.; DE ANDRADE, H.M.; VAINSTEIN, M.H.; WANKE, B.; SCHRANK, A.; BALAGUEZ, C.B.; DOS SANTOS, P.R.; SANTI, L.; PIRES, S.F.; DA SILVA, A.S.; DE CASTRO, J.A.; BRANDÃO, R.M.; DO MONTE, S.J. Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: novel candidate antigens for diagnosis. **Future Microbiol.**, v. 8(4), p. 549-63, 2013.
105. TEUTSCHBEIN, J.; SIMON, S.; LOTHER, J.; SPRINGER, J.; HORTSCHANSKY, P.; MORTON, C.O.; LÖFFLER, J.; EINSELE, H.; CONNEALLY, E.; ROGERS, T.R.; GUTHKE, R.; BRAKHAGE, A.A.; KNIEMEYER, O. Proteomic profiling of serological responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in patients with invasive aspergillosis. **J. Prot. Res.**, v. 15(5), p. 1580-91, 2016.
106. KNIEMEYER, O.; EBEL, F.; KRÜGER, T.; BACHER, P.; SCHEFFOLD, A.; LUO, T.; STRASSBURGER, M.; BRAKHAGE, A.A. Immunoproteomics of *Aspergillus* for the development of biomarkers and immunotherapies. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 10(9-10), p. 910-21, 2016.
107. GAUTAM, P.; SUNDARAM, C.S.; MADAN, T.; GADE, W.N.; SHAH, A.; SIRDESHMUKH, R.; SARMA, P.U. Identification of novel allergens of *Aspergillus fumigatus* using immunoproteomics approach. **Clin. Exp. Allergy**, v. 37, p. 1239-49, 2007.

108. HARO-HERNÁNDEZ, C.; LLOPIS, S.; MOLINA, M.; MONTEOLIVA, L.; GIL, C. Immunoproteomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* systemic infection in a murine model. **J. Prot.**, v. 112, p. 14-26, 2014.
109. LEE, P.Y.; GAM, L.H.; YONG, V.C.; ROSLI, R.; NG, K.P.; CHONG, P.P. Immunoproteomic analysis of antibody response to cell wall-associated proteins of *Candida tropicalis*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 117, p. 854-65, 2014.
110. PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Seroprofiling at the *Candida albicans* protein species level unveils an accurate molecular discriminator for candidemia. **J. Prot.**, v. 16, p. 144-62, 2016.
111. CASTRO, R.A.; KUBITSCHKEK-BARREIRA, P.H.; TEIXEIRA, P.A.; QUINTELLA, L.P.; ALMEIDA, S.R.; COSTA, R.O.; CAMARGO, Z.P.; FELIPE, M.S.; DE SOUZA, W.; LOPES-BEZERRA, L.M. 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.
112. RODRIGUES, A.M.; FERNANDES, G.F.; ARAUJO, L.M.; DELLA TERRA, P.P.; DOS SANTOS, P.O.; PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, T.M.; BURGER, E.; LOPES-BEZERRA, L.M.; DE CAMARGO, Z.P. Proteomics-based characterization of the humoral immune response in sporotrichosis: toward discovery of potential diagnostic and vaccine antigens. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9 (8), p. e0004016, 2015.
113. DELLA TERRA, P.P.; RODRIGUES, A.M.; FERNANDES, G.F.; NISHIKAKU, A.S.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z.P. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.11(8):e0005903, 2017.
114. SUDMAN, M.S. Protothecosis a critical review. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 61, p. 10-9, 1974.
115. IRRGANG, A.; WEISE, C.; MURUGAIYAN, J.; ROESLER, U. Identification of immunodominant proteins of the microalgae *Prototheca* by proteomic analysis. **New Microbes New Infect.**, v. 3, p. 37-40, 2014.
116. SAIN, M.; REP, M. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. **Int. J. Mol. Sc.**, v. 16, p. 23970-93, 2015.
117. WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, p. 315–22, 1990.
118. 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.
119. 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.

120. 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.
121. 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. **Nat. Protoc.**, v. 11(1), p.102-17, 2016.
122. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, v. 4(45), p. D158-69, 2017.
123. OLIVEROS, J.C. NoVENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams Title <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
124. 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 Res.*, v. 43, p. D447-52, 2015.

Artigo Científico
Redigido de acordo com as normas da Revista
Frontiers in Microbiology (FI 4,259)

Prospecting biomarkers for diagnostic and therapeutic approaches in pythiosis

Jéssica Luana Chechi^{a*}, Tiwa Rotchanapreeda^b, Giselle Souza da Paz^c, Ana Carolina Prado^a, Alana Lucena Oliveira^c, José Cavalcante Souza Vieira^a, Marília Afonso Buzalaf^d, Lucilene Delazari dos Santos^{e,f}, Theerapong Krajaejun^b, Sandra de Moraes Gimenes Bosco^{a,c,e*}

^a Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

^b Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

^c Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

^d Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo (USP), Bauru, Brazil.

^e Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

^f Graduate Program in Tropical Diseases, Botucatu Medical School (FMB), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

*** Corresponding author:**

E-mail addresses: jlchechi@gmail.com (J.L. Chechi), sandra.bosco@unesp.br (S.M.G. Bosco).

Abstract

Pythiosis, whose etiological agent is the oomycete *Pythium insidiosum*, is a 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 misdiagnosed with Mucorales or Entomophthorales fungi in histological sections. In addition, there is no specific antigen for a rapid diagnosis, that could contribute to improve the prognosis of pythiosis in different animal species. Antigens are molecules that the immune system recognize, and are used as targets for the diagnosis of microorganisms. Immunoproteomics is considered a promising and powerful tool for antigen identification and, in this sense, we investigated which *P. insidiosum* antigens may be recognized by horses and humans with pythiosis from Brazil and Thailand, respectively, by using 2D Western blot followed by mass spectrometry for identification of antigens. We identified 23 antigens 14 recognized between a pooled of serum from horses and humans. Seven antigens were commonly recognized by both species, such as: 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 recognized by the immune responses of horses and humans and these antigens may be studied as biomarkers for improving diagnosis and therapy approaches.

Keywords: *Pythium insidiosum*, pythiosis, antigens, diagnosis, immunoproteomics, 2D Western blot.

1. Introduction

Pythiosis, whose etiological agent is the oomycete *Pythium insidiosum*, is an emerging and life-threatening disease that occurs most frequently in tropical and subtropical countries, affecting several animal species, especially horses, dogs and humans¹⁻³. This pathogen is a colonizing agent of aquatic plants, in which occurs the asexual reproduction by the production of sporangia which, when mature, rupture and release zoospores, the infective form of *P. insidiosum*. Zoospores move in the water until they find another plant or animal with injured tissue, in which they encyst and emit a germ tube, creating a new hypha that induces the appearance of lesions^{3,4}.

Due to the recurrent presence in regions with water accumulation, the horse is the species most affected by the disease in the world, with skin lesions being the most frequent. In the lesions, hyphae are observed covered by necrotic cells that form white-yellowish masses called "kunkers". The intestinal form may also be present and the animals affected have episodes of colic due to obstruction of the intestinal lumen^{5,6}.

In humans, the disease is common in Southeast Asia, mainly in Thailand, and can also be found in the Americas and Oceania. Cutaneous and subcutaneous lesions are usually granulomatous or eye lesions, such as keratitis and corneal ulcers⁷. Another clinical manifestation of human disease is systemic or vascular, which is considered to be the most serious because it results in occlusion of the vessels⁸. In Brazil, a single report of human pythiosis was described, in the state of São Paulo, whose source of infection was due to fishing activity^{9,10}.

The disease is difficult to diagnose, since the pathogen's hyphae are often confused with Mucorales or Entomophthorales in histological sections and diagnostic methods used in the identification of *P. insidiosum* is time-consuming¹¹⁻¹⁵. The diagnosis of pythiosis is traditionally based on the association of clinical manifestations with culture identification¹⁶⁻¹⁸, serodiagnostic tests^{11,15,19-26} and molecular assays^{13,18,27-29}. The treatment of pythiosis is also difficult because the pathogen does not respond satisfactorily to the available antifungals, and it is necessary to perform surgical procedures, often extensive, when possible^{1,3}.

Studies involving *P. insidiosum* antigens from human pythiosis, have identified a 74 KDa protein, which has been considered as an immunodominant

antigen³⁰. This protein was identified as β -glucanase, once it showed homology with similar protein in *Phytophthora infestans*, an oomycete phylogenetically close to *P. insidiosum*³¹. Elicitin antigen, found in the *P. insidiosum* secretome, was analyzed in immunohistochemical tests showing 100% sensitivity in the histological sections of pythiosis tested^{14,32}. Protein profile of *P. insidiosum* from equine pythiosis, detected antigens of different molecular weights (~ 50-55 KDa and ~ 34 KDa), when incubated with serum from infected dogs, rabbits, horses and cattle. However, serum immunoreactive proteins have not been identified³³.

Given the above, the present study was conducted with the objective of identify similar *P. insidiosum* antigens in equine and human pythiosis, with potential for putative biomarker in diagnosis, as well as therapeutics in pythiosis. For that, the immunoproteomic analysis was performed to select the immunoreactive molecules to the serum of these infected species.

2. Materials and methods

2.1. Pythium insidiosum strain and culture conditions

Pythium insidiosum strain used in this study, named “Eq10”, was isolated from a male horse with pythiosis from state of São Paulo. The identification of this isolate was confirmed molecularly by DNA sequencing of ITS (Internal Transcribed Spacer) region of ribosomal DNA with the panfungal primers ITS4-ITS5. The mycelial fragments of the isolate were transferred to Erlenmeyers, containing 100 mL of Sabouraud Dextrose Broth (Difco, Detroit, USA), and incubated under shaking (ES-20 Orbital Shaker-Incubator) at 120 rpm at 37°C for five days. After that period, Sabourad both was removed and the mycelial mass was washed three times with deionized sterile water.

2.2. Protein sample extraction

The extraction of *P. insidiosum* proteins was obtained as described by Rodrigues et al., with modifications³⁴. The mycelial mass was frozen in liquid nitrogen and disrupted by grinding with a pestle until a fine powder was obtained. The powder mycelium was submitted to the Precellys instrument (2 cycles of 20 seconds; Bertin instruments), in 1 mL of Tris–Ca²⁺ buffer (20 mM Tris–HCl pH 8.8, 2 mM CaCl₂) containing a commercial cocktail of protease inhibitors (1:100; GE Healthcare, USA), RNase, and DNase enzymes (1:100; GE Healthcare,

USA); and glass beads (Sigma 425–600 μm). After, cell debris and glass beads were removed by centrifugation at 14,000 x g for 10 minutes at 4°C, and dithiothreitol (20 mM; Sigma) added to the supernatant. The protein concentration was determined by the Bradford (Bio-Rad) method³⁵ and the sample was kept at -80° C.

2.3. Serum samples from infected horses and humans

Serum samples from confirmed infected horses were collected during animal care at the Veterinary Hospital from the School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil, during the years 2008 and 2018 and stored at -20°C until use. In order to increase the recognition of seroreactive spots and avoid patient-specific effects, the samples were pooled (n=22). Normal horse serum samples (n=5) from animals without evidences of other mycotic diseases were used as a control.

Immunoblot was also performed with pooled serum from humans (n=10) with pythiosis from Thailand. These patients had the diagnosis confirmed by culture identification and serological tests at Ramathibodi Hospital, Department of Pathology, Bangkok, Thailand. All serum samples were stored at -20°C until use. Serum from healthy Thai humans, who came to the Blood Bank Division, Ramathibodi Hospital, were used as control.

2.4. Two-dimensional gel electrophoresis

Proteins (150 μg) were precipitated using acetone 80% (1:4), following 1h30min at 4°C and centrifugation at 14,000 x g for 10 minutes at 4°C. Proteins were diluted with commercial rehydration solution, DeStreak (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and 1% [v/v] isoelectric focusing (IEF) buffer (GE Healthcare, USA) pH 4–7, final volume of 125 μL . Isoelectric focusing was performed using the Ettan IPGphor III system (GE Healthcare, USA). IPG strips (pH 4–7, 7 cm) were rehydrated overnight and subsequently focused at 300 V for 1 h, 1000 V for 1 h, 5000 V for 1 h, and 5000 V for 40 min. Finally, the voltage was set to 5000 V until 7,000 Vhr, all performed at 20 °C. The Immobilized pH gradient (IPG) strips (GE Healthcare, SWE) were equilibrated in 19 mM Dithiothreitol (DDT) in equilibration buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 20% glycerol, 2% [w/v] SDS, and 0.01% [w/v] bromophenol blue) for 15 min, followed of 0.2 M

iodoacetamide in equilibrium buffer for 15 min. The second dimension was performed on 12.5% (w/v) polyacrylamide gels, sealed with 0.5% agarose and proteins separated using Mini-Protean Tetra cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; 150 V for 15 min and 200 V for 100 min). After separation, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (50% [v/v] ethanol, 5% [v/v] acetic acid) for 60 min³⁶ or directly transferred in the case of immunoblot analysis. The gels were scanned using the ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) calibrated in transmission mode.

2.5. 2D immunoblot of *P. insidiosum* proteins

Pythium insidiosum proteins were resolved by 2D gel electrophoresis followed by immunoblot in order to evaluate seroreactive spots to serum from horses and humans with pythiosis. The proteins were transferred onto a 0.2 µm nitrocellulose membrane using Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad, USA) at 25 V for 15 min using Trans-Blot® Turbo™ Blotting System (Bio-Rad, USA). The transference of the spots to the membrane was evaluated by Ponceau'S (0.15% Ponceau'S and 1% [v/v] acetic acid) staining.

The membranes were destained and then blocked overnight in TBST blocking buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 137 mM NaCl; 0.1% [v/v] Tween 20, supplemented with 5% [w/v] skim milk; pH 7.4) at 4°C under constant shaking. To perform immunoblot from horse's serum, the membranes were probed with primary antibody diluted 1:100 (pooled serum from horses) for 4 h at 4°C, under constant shaking. After, the membranes were washed three times with washing buffer (TBS, pH 7.5; 0.05% Tween 20) for 5 min and incubated with secondary antibody anti-horse IgG (whole molecule)- Peroxidase, antibody produced in rabbit (Sigma, ref. A6917, USA) at a 1:1000 dilution for 2 h at room temperature. The membranes were washed with washing buffer and labeling was conducted by chemiluminescence (Immobilon^R Classico Western HRP Substrate, Merck Millipore, USA) and image analyzer Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences). Immunoblot from Thai patient's serum was performed with some modifications. Membranes were probed with primary antibody diluted 1:1000 (pooled serum of human patients) for 2 h at room temperature, under constant shaking. After, the membranes were washed three times with washing buffer (TBS, pH 7.5; 0.05% Tween 20) for 5 min and incubated with secondary antibody

goat anti-human immunoglobulin G conjugated with horseradish peroxidase (Bio-Rad, USA) at a 1:5000 dilution for 2 h at room temperature. Next, the membranes were washed with washing buffer and labeling was conducted by chemiluminescence (Pierce ECL Western Blotting Substrate; Thermo Fisher, USA) and image analyzer ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA)³⁰. The gels and membranes images were analyzed by software Image Master 2D Platinum (7.0 version, GE Healthcare, USA).

2.6. Trypsin digestion and mass spectrometry

The 2D immunoblot seroreactive proteins were manually excised, destained with 50% [v/v] ethanol, and 2.5% [v/v] acetic acid solution, dehydrated with 100% [v/v] acetonitrile (gradient grade; Merck, Germany), and 50 mM ammonium bicarbonate (99.5% purity; Sigma Chemical, Spain), and digested with trypsin (sequencing grade; Promega, Spain)³⁷.

The analyzes of the triptych peptides by mass spectrometry were performed using an Ultimate 3000 LC liquid nanochromatography equipment (Dionex, Germering, Germany) coupled to a Q-Exactive mass spectrometry equipment (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The mobile phases used were: A) 0.1% [v/v] formic acid in LCMS water and B, 0.1% [v/v] formic acid in 80% [v/v] acetonitrile. The peptides were loaded on a C18 pre-column, 30µm x 5mm (Code 164649, Thermo Fisher Scientific), and desalinated in an isocratic gradient of 4% B for 3 minutes at a flow of 300 nL/min. Then, the peptides were fractionated by a Reprosil-Pur C18-AQ analytical column, 3 µm, 120 Å, 105 mm, Code 1PCH7515-105H354-NV (PICOCHIP) using a linear gradient of 4-55% B for 30 min, 55% at 90% B for 1 min, maintained at 90% B for 5 minutes and rebalanced at 4% B for 20 minutes at a flow of 300 nL/min. Ionization was achieved using a Nanospray ion source (PICOCHIP). The mode of operation was positive ionization using the DDA method. The MS spectra were acquired from m/z 200 to m/z 2000, resolution of 70,000 and 100 ms of injection time. The fragmentation chamber was conditioned with collision energy between 29 to 35% with a resolution of 17,500, 50 ms of injection time, 4.0 m/z of isolation window and dynamic exclusion of 10s. Spectrometry data was acquired using the Thermo Xcalibur software (version 4.0.27.19, Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.7. Bioinformatics analysis

The analysis of the raw data, of the mass spectrometry, in the .RAW format were submitted to the PatternLab software (version 4.0.0.84)³⁸ to obtain the protein identification. The main parameters used in this tool were: NCBI database (taxonomy *Phytophthora infestans*); trypsin enzyme; permission for 2 missing cleavages; post-translational carbamidomethylation modification of cysteine residues; variable post-translational modification oxidation of methionine residues; tolerance errors MS 40 ppm and MS/MS 0.0200 ppm. The maximum FDR (False Discovery) rate was considered to be $\geq 1\%$.

The localization of protein was made using UniProt³⁹. Comparative analyses of data were performed in Venny 2.1 program⁴⁰. The protein–protein interaction networks were constructed using the online STRING database (<https://string-db.org>) version 11.0. The STRING network analyze was performed with a medium confidence level (0.4)⁴¹.

3. Results

3.1. Protein profile of *Pythium insidiosum* and immunoreactive proteins

The protein profile, the location of the spots and the identification of proteins, shown in our previous work⁴², were consistent with the results obtained in the present study, thus demonstrating the robustness of the methodology used. The protein profile of the different *P. insidiosum* isolates studied is similar in terms of the number and molecular weight of bands and spots observed in the 1D and 2D-PAGE electrophoresis, respectively (Supplemental Figure S1 and S2). Therefore, we conducted the present work using the *P. insidiosum* strain called "Eq-10".

The protein extraction protocol, Tris-Ca²⁺, was suitable for the study of *P. insidiosum* antigenic molecules, generating samples with a high quantity of proteins (2,23 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and not degraded (Figure 1; Supplemental Figure S1 and S2). To evaluate the samples, 150 μg of proteins were separated by two-dimensional electrophoresis. Initially, immobilized pH gradient (IPG) strips ranging from 3 to 10 were used. The gels obtained showed low resolution of spots in the pH range from 3 to 10 and better separation of spots by isoelectric point using strips with pH range of 4-7 (Supplemental Figure S3). Thus, the 2D

electrophoresis were conducted using an immobilized pH gradient of 4-7, obtaining better sample resolution and separation.

Two-dimensional gel Western blotting analysis revealed a total of 23 spots of proteins that were immunoreactive to the pooled serum of horses and humans diagnosed with pythiosis (Fig. 1). Nineteen spots with molecular weight (MW) ranging from 28 to 88 KDa and isoelectric point (pI) between 4.58 and 6.60 were detected by the horse sera (Fig. 1A) and human sera (Fig. 1B). The control serum of horses and humans were not immunoreactive (data not shown).

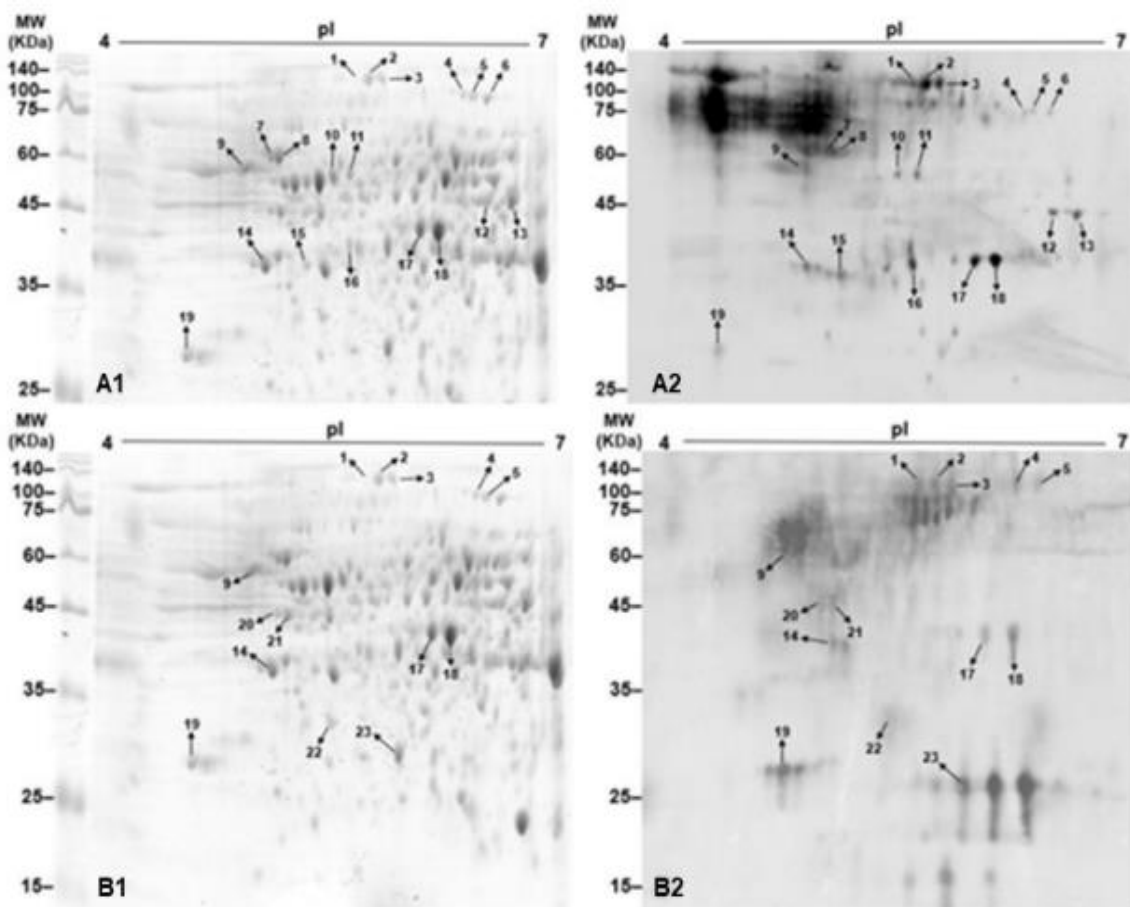


Figure 1. 2D protein profile of Eq-10 isolate of *Pythium insidiosum* (A1, B1). Identification of immunoreactive proteins from *P. insidiosum* by 2-D Western blot analysis in pooled horse serum (A2) and pooled human serum (B2). The numbers of the spots refer to the identification used in Tables 1 and 2. The experiments were run in triplicate.

A total of sixteen individual proteins were successfully identified by mass spectrometry from 23 immunoreactive spots (Table 1 and Table S1). Ten spots (1-5, 9, 14, 17, 18 and 19; Fig. 1 A2 and B2) were immunoreactive for both horse

and human serum, identified and corresponded to seven individual proteins listed in Table 2.

Table 1. Summary of immunoreactive proteins in *Pythium insidiosum* identified by mass spectrometry.

| Spot no | Protein name | Accession no (Uniprot) | Gene | Pred MW (kDa) | pI | Protein Score | Coverage (%) |
|---------|---|------------------------|------------|---------------|------|---------------|--------------|
| 1 | Heat shock cognate 70 kDa protein | D0NHI7 | PITG_11913 | 86 | 5.54 | 66.239 | 16 |
| 2 | Heat shock cognate 70 kDa protein | D0NHI7 | PITG_11913 | 86 | 5.65 | 54.232 | 14 |
| | Glucan 1,3-beta-glucosidase | D0NEL9 | PITG_10218 | 69 | 5.65 | 40.664 | 7 |
| 3 | Heat shock cognate 70 kDa protein | D0NHI7 | PITG_11913 | 86 | 5.74 | 41.397 | 14 |
| | Glucan 1,3-beta-glucosidase | D0NEL9 | PITG_10218 | 69 | 5.74 | 17.895 | 5 |
| 4 | Aconitate hydratase | D0NY26 | PITG_18048 | 88 | 6.26 | 122.175 | 23 |
| 5 | Aconitate hydratase | D0NY26 | PITG_18048 | 88 | 6.35 | 191.649 | 27 |
| 6 | Aconitate hydratase | D0NY26 | PITG_18048 | 88 | 6.47 | 164.533 | 26 |
| 7 | Chaperonin CPN60-1 | D0NHM8 | PITG_11966 | 63 | 5.07 | 293.798 | 34 |
| 8 | Chaperonin CPN60-1 | D0NHM8 | PITG_11966 | 63 | 5.12 | 359.499 | 35 |
| 9 | Heat shock 70 kDa protein | D0NSJ5 | PITG_15786 | 68 | 4.90 | 12.61 | 8 |
| 10 | 6-phosphogluconate dehydrogenase | D0NE49 | PITG_10032 | 53 | 5.46 | 82.972 | 28 |
| 11 | Vacuolar proton pump subunit B | D0N6F5 | PITG_06118 | 57 | 5.55 | 248.97 | 50 |
| 12 | Isocitrate dehydrogenase [NADP] | D0N755 | PITG_07056 | 48 | 6.47 | 188.754 | 43 |
| 13 | Isocitrate dehydrogenase [NADP] | D0N755 | PITG_07056 | 48 | 6.60 | 183.697 | 44 |
| 14 | Serine/threonine-protein phosphatase | D0MXY7 | PITG_03574 | 35 | 5.06 | 10.346 | 23 |
| 15 | 40S ribosomal protein SA | D0MUE8 | PITG_01922 | 31 | 5.22 | 72.538 | 26 |
| 16 | Transaldolase | D0N3B2 | PITG_05636 | 37 | 5.74 | 24.121 | 16 |
| 17 | Fructose-bisphosphate aldolase | D0MX78 | PITG_02785 | 43 | 6.00 | 25.961 | 4 |
| 18 | Fructose-bisphosphate aldolase | D0MX78 | PITG_02785 | 43 | 6.14 | 246.075 | 26 |
| 19 | 14-3-3 protein epsilon | D0NYS2 | PITG_19017 | 28 | 4.58 | 425.094 | 82 |
| 20 | Arginase | D0N266 | PITG_04851 | 38 | 5.00 | 59.674 | 13 |
| 21 | Arginase | D0N266 | PITG_04851 | 38 | 5.10 | 115.704 | 17 |
| 22 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] | D0N0G8 | PITG_04065 | 38 | 5.34 | 46.334 | 20 |
| 23 | Triosephosphate isomerase | D0MZB6 | PITG_03078 | 25 | 5.81 | 52.947 | 14 |

Table 2. Immunoreactive proteins matching between pooled horse and human serum. Biological process based on Uniprot database.

| Spot no | Protein | Biological process |
|------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1, 2 and 3 | Heat shock cognate 70 kDa protein | stress response |
| 2 and 3 | Glucan 1,3-beta-glucosidase | carbohydrate metabolic process |
| 4 and 5 | Aconitate hydratase | tricarboxylic acid cycle |
| 9 | Heat shock 70 kDa protein | protein folding and stress response |
| 14 | Serine/threonine-protein phosphatase | phosphoprotein phosphatase activity |
| 17 and 18 | Fructose-bisphosphate aldolase | glycolytic process |
| 19 | 14-3-3 protein epsilon | signaling protein ligands |

3.3. Bioinformatics identification

Immunoblot of *P. insidiosum* with pooled horse and human serum resulted in sixteen proteins, represented in the Venn diagram (Fig. 2). Horse and human sera showed thirteen and ten proteins, respectively. Among these proteins, six (37.5%) of which were exclusive from horses, three (18.8%) from humans and seven (43.8%) were common (Fig. 2).

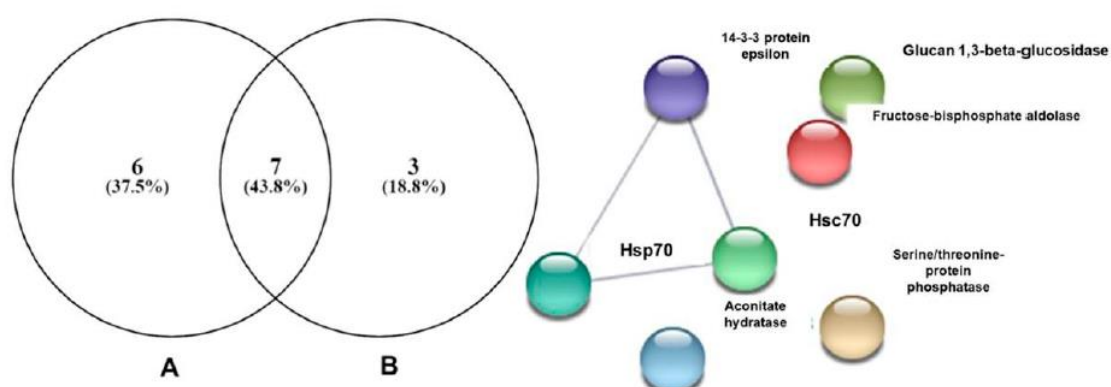


Figure 2. Venn diagram (left) of proteins identified in the immunoblot with horse (A) and human serum (B). Network interaction (right) of the seven matching antigens between pooled horses and human's serum.

Protein interaction occurs among 14-3-3 protein epsilon, heat shock 70 kDa protein (Hsp 70) and heat shock cognate 70 kDa protein (Hsc 70). The other

proteins, glucan 1,3-beta-glucosidase, fructose-bisphosphate aldolase, serine/threonine-protein phosphatase and aconitate hydratase, showed no connection.

4. Discussion

Early diagnosis is essential for successful treatment of pythiosis. Actually, the accurate diagnosis of pythiosis includes culture identification¹⁶⁻¹⁸, which is time-consuming and may fail to grow the organism; molecular assays, based on PCR, requiring qualified personnel and specialized equipment^{13,26-29}; serodiagnostic tests (immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], immunochromatographic tests, Western blot and hemagglutination) for the detection of antibodies in the serum, however such tests produce false-negative results^{11,15,19-26}. The present work adopted an immunoproteomic approach to compare antibody responses in horse and human serum for the identification of new serodiagnostic targets in pythiosis.

The proteins extracted from *P. insidiosum* were fractionated in 2-D PAGE and evaluated using the Western blot technique with pooled horse and human serum with pythiosis. Twenty-three immunoreactive spots were detected and resulted in the identification of sixteen individual proteins, since the same protein was identified in two or more spots. The presence of the same protein in multiple spots can be observed due to the existence of natural isoforms, post-translational modifications, or differences in sample preparation⁴³.

Among the seven matching spots, the protein identification revealed heat shock cognate 70 KDa protein (Hsc 70), heat shock 70 KDa protein (Hsp 70), glucan 1,3-beta-glucosidase, fructose-bisphosphate aldolase, aconitate hydratase, serine/threonine-protein phosphatase, 14-3-3 protein epsilon (Table 2). Heat shock cognate 70 KDa protein was detected in three spots (1, 2 and 3; Table 1, Fig. 1), this protein belongs to the heat shock protein 70 family^{44,45}, along with heat shock 70 KDa protein (spot 9; Table 1, Fig. 1). Hsp 70 and Hsc 70 are chaperones found in all organisms, from bacteria to humans, in the cell membrane, cytoplasm, nucleus, endoplasmic reticulum and mitochondria and play a critical role in various routine biological processes involving both systemic and cellular stress related to changes in temperature⁴⁶⁻⁴⁸. In *Saccharomyces cerevisiae*, a mutation in the gene Y7, caused temperature sensitivity during its

growth. Analyzing the mutant yeast suppressor genes, the SSB1 gene was observed, which codes for heat shock cognate 70 KDa protein. The introduction of this gene in mutant cells supplied the defects in temperature sensitivity and facilitated the degradation of proteins encoded by genes with the mutation⁴⁹. Hsp 70 protein from *Paracoccidioides brasiliensis* was recognized by serum from patients with paracoccidioidomycosis⁵⁰. Studies related to Hsp 70 and Hsc 70 proteins and their functions in oomycetes are scarce. We believe that these proteins are important in the pathogenicity of *P. insidiosum*, since the pathogen is found in the environment and when it invades a host tissue, it needs to adapt to the higher temperature promoting the repair and modeling of proteins fundamental to its growth⁴².

The glucan 1,3-beta-glucosidase protein was identified in the spots 2 and 3 (Fig. 1), although this enzyme is not the most abundant protein in both spots, heat shock cognate 70 KDa protein appears as the first identification with highest score (Table 1, Supplemental Table S1). However, this enzyme has been previously found in isolates of *P. insidiosum* in Brazil⁴² and also described as being immunodominant in studies conducted with serum from Thai patients with pythiosis^{30,31}. Phylogenetical analysis with the *exo1* gene, which codes for exo-1,3- β -glucanase, grouped this gene close to other oomycetes and far true fungi. The authors highlight this enzyme as a target for the development of vaccines and drugs against the pathogen⁵¹. A study carried out with the pathogenic fungi *Histoplasma capsulatum*, identified two proteins, endo and exo- β -1,3-glucanase, highly active in yeasts under infection conditions, while in the mycelial form (environmental form) these proteins are minimally expressed. These proteins were related to the pathogenicity of *H. capsulatum*^{52,53}. Glucanase enzyme, endo-1,3(4)-beta-glucanase, was also found as an antigen in the secretome of *Paracoccidioides* spp. (*P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis*) yeast forms⁵⁴. The β -glucans are the main structural components of fungal cell walls, in combination with other molecules that provide strength and rigidity^{55,56}. Many fungi produce exocellular enzymes that degrade β -glucans, the β -glucanases (β -1,3 and β -1,6-glucanases)^{57,58}. The glucan 1,3-beta-glucosidases identified in the present study is essential in the development of *P. insidiosum*, because they play a fundamental role in the morpho-physiological processes of the cell wall, thus favoring the growth of hyphae.

Mass spectrometry and bioinformatics of the spots 17 and 18 (Fig. 1, Table 1) resulted in the identification of the fructose- 1,6-bisphosphate aldolase (Fba) protein, with molecular mass of 43 KDa and isoelectric points of 6.00 and 6.14, respectively (Table 1). Fba proteins are enzymes used in glycolysis and gluconeogenesis, and are classified into class I and class II ⁵⁹⁻⁶¹. Class I enzymes are present in plants, animals, algae and prokaryotes. Class II, on the other hand, requires a metallic ion (Zn^{2+} or Fe^{2+}) in the catalytic cycle. Class II is absent in animals and plants, but it is essential to protozoa, micro-algae, bacteria and fungi, favoring studies with this enzyme as targets for new drugs ⁶²⁻⁶³. This enzyme was highlighted in a recent study with the pathogenic fungus *Paracoccidioides lutzii*, by identifying 215 proteins of *P. lutzii* that interacted with macrophage proteins. Among the proteins identified, two were identified as serine proteinase (also found in this study, spot 14, Fig. 1) and Fba, both expressed on the surface of the pathogen during interaction with macrophages in the infectious process ⁶⁴. Fba was one of the *Candida albicans* proteins selected, by peptide epitope search algorithms, for developing a vaccine for candidiasis and showed the best results in reducing renal fungal load ^{65,66}. In pathogenic fungi *Cryptococcus neoformans* ⁶⁷ and *Paracoccidioides lutzii* ⁶⁸, Fba binds to host molecules and performs an adhesion function, in addition to their glycolytic activity. In this sense, we believe that the Fba protein found in our study may be involved in the interaction with host cells in the adhesion process, participating in the virulence process of *P. insidiosum*.

Serine/threonine-protein phosphatase (spot 14, Fig. 1, Table 1) identified in the present study is an important mediator of fungal proliferation and development, as well as infection-related morphogenesis and transduction. These proteins have the function of phosphorylation and are essential to fundamental processes in fungi, such as cell cycle and transcription ⁶⁹. A study with *Saccharomyces cerevisiae* showed that the deletion of the SIT4 gene, which encodes the serine/threonine-protein phosphatase, increases the sensitivity of the yeast to azoles, cycloheximide, daunorubicin, rhodamine B and rhodamine 6G, suggesting a new therapeutic approach⁷⁰. The deletion of the gene that codes for this same protein was also analyzed in *C. albicans* ⁷¹ and *Aspergillus fumigatus* ⁷², resulting in more sensitivity to oxidative stress of immune cells of the host ⁷³. Undoubtedly this may be an important discovery, since to avoid the

host's innate immune system, pathogens need to survive oxidative conditions in neutrophils and macrophages⁷⁴.

Another antigen detected was the aconitate hydratase or aconitase (spots 4 e 5, Fig. 1, Table 1). Aconitase plays a role in the Krebs cycle, catalyzing the conversion of citric acid to isocitric acid, resulting in molecules that produce energy and essential precursors for carbohydrates and amino acids⁷⁵. In addition, to its role in the Krebs cycle, this enzyme functions as an iron regulatory protein, controlling the expression of the ferritin and transferrin receptor in mammalian cells⁷⁶. In *S. cerevisiae*, aconitase was characterized as a conjugated protein containing an iron-sulfur prosthetic group, which acts on both substrates linking to the active site or in catalysis⁷⁷. The expression of this enzyme was evaluated in *P. brasiliensis* in the yeast and mycelium phases, under cultivation conditions in carbon sources or different levels of iron. Aconitase was more abundant in the yeast phase and when the fungus was incubated with C₂ carbon source or high iron concentration⁷⁵. An increase in the expression of aconitase over a high iron concentration was also observed in *C. neoformans*⁷⁸. The possible role of aconitase in regulating the mechanisms of iron levels is supposed⁷⁵. Many pathogens, both prokaryotes and eukaryotes, need iron in its vital metabolic process⁷⁹⁻⁸¹. Genetic studies with *P. insidiosum* isolates from Thailand showed the gene that encodes for the enzyme ferrochelatase⁸², which is needed for the heme biosynthesis by catalyzing the introduction of iron into porphyrin⁷⁹. Information about iron metabolism in *P. insidiosum* is scarce, however, an important predisposing factor in human pythiosis, in Thailand, is thalassemia. Patients presenting thalassemia show an overload of circulating iron that could benefit *P. insidiosum*. Anemic rabbits experimentally infected with *P. insidiosum* showed lesions larger than those in the control group⁸³.

Finally, spot 19 (Fig. 1, Table 1) identified the 14-3-3 protein epsilon, which is highly conserved in eukaryotes and abundant in phospho-serine/ threonine binding proteins⁸⁴⁻⁸⁶. The 14-3-3 epsilon media metabolism and signal transformation networks through bonds to other proteins^{85,87}, these bonds affect the conformation and function of target proteins⁸⁶. Deregulation of this protein is involved in disease progression and pathogenesis⁸⁷. In *Paracoccidioides brasiliensis*, the 14-3-3 protein (Pb14-3-3) is highly expressed in virulent isolates and has the function of an adhesion protein⁸⁸. Downregulation of Pb14-3-3

expression exhibit modifications such as more elongated cells, impairment in dimorphism, decreased interaction with pneumocytes and reduction in bud number⁸⁹. Still in *P. brasiliensis*, Marcos et al.⁹⁰ observed that the downregulation of the 14-3-3 protein alters the pathogen's ability to cause host cell apoptosis, which may be due a consequence of decreased secretion of Pb14-3-3 or the loss of putative adherence mediated by 14-3-3. In *Pythium insidiosum* this protein may be related to the virulence of the pathogen favoring the adhesion process, as mentioned in the literature.

In the present study we have identified and characterized antigens recognized by horses and human's sera with pythiosis. These proteins can be prospecting as biomarkers for new diagnosis of pythiosis, as well as for therapeutic purposes of this important neglected disease.

5. Conclusion

A total of 23 immunoreactive spots were identified for pooled horses' serum from Brazil and human's serum from Thailand. The spots were identified by mass spectrometry and bioinformatics analysis, resulting in 16 unique proteins. Seven matching antigens were discussed and related to their functions in different pathogenic fungi, are their glucan 1,3- β -glucosidase, Hsc 70, Hsp 70, aconitate hydratase, serine/threonine-protein phosphatase, fructose-biphosphate aldolase, 14-3-3 protein epsilon. The seven matching antigens found here may be promising for studying new methods for diagnosing and therapy of pythiosis.

Disclosures

The authors declare that they have no conflicts of interest related to the contents of this article.

Acknowledgments

This work was supported by the São Paulo Research Foundation – FAPESP (grants 2016/10804-8, 2018/08009-0 and 2019/08761-7) and

Coordination of Superior Level Staff Improvement – CAPES (code 001). We are thankful to the Institute of Biotechnology (IBTEC), UNESP for the proteomics analyses conducted in this work and the Center for the Study of Venoms and Venomous Animals – CEVAP (UNESP, Botucatu, SP, Brazil) for the support in the two-dimensional electrophoresis method. We also thank the Research Center, Mahidol University, Thailand, for their support with the assays conducted at this center.

References

1. Gaastra, 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.; Rochanawutinin, 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.; Rozenbids, 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.; Pracharktam, 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.; Lowhnoo, 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 elicitor-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. Inferring 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 Lorgeril, 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.; Mcllroy, 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. Labeé, 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. Labbé, 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ao, 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on, M.; Martinez, 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.; Dontumprai, R.; Chan-On, W.; Buates, S.; Laha, T.; Sripa, B.; Suttiyapra, 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.