

PERFIL PROTEICO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Pythium insidiosum* **– RESULTADOS PARCIAIS**

BEATRIZ PERSICI MARONEZE¹; JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA VALENTE²;
ANELISE OLIVEIRA FONSECA³; FERNANDO DE SOUZA MAIA FILHO⁴; SÔNIA
DE AVILA BOTTON⁵; MARIA ISABEL DE AZEVEDO⁶; DANIELA ISABEL BRAYER
PEREIRA⁷

¹Universidade Federal de Pelotas- RS- beatrizpersici@ibest.com.br; ²Universidade Federal de Pelotas - RS - juliassilveira@gmail.com; ³Universidade Federal de Pelotas- RS- anelise_fonseca@yahoo.com.br; ⁴Universidade Federal de Pelotas - RS- fmaia2404@yahoo.com.br; ⁵Universidade Federal de Santa Maria- RS- sabott20@gmail.com; ⁶Universidade Federal de Santa Maria- RS- beelazevedo@gmail.com; ⁷Universidade Federal de Pelotas- RS- danielabraye@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum* é o agente etiológico da pitiose, uma enfermidade infecciosa de difícil tratamento que afeta principalmente, mamíferos e humanos. A enfermidade é descrita em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (GAASTRA et al., 2010), sendo o Brasil considerado endêmico para a pitiose equina (MENDOZA et al., 1996).

A pitiose está relacionada ao contato de animais e seres humanos com águas contaminadas por zoósporos móveis (forma infectante) produzidos pelo agente.

Em todas as espécies afetadas o prognóstico da doença é desfavorável, podendo ocorrer a morte, especialmente quando não tratadas. O tratamento é difícil e as terapias utilizadas apresentam resultados variados e incluem imunoterapia, cirurgia e combinação de antimicrobianos (GAASTRA et al., 2010). Os imunoterápicos apresentam propriedades curativas, sendo aplicados em animais com doença clínica. Como seu efeito curativo é lento e o tratamento é prolongado, algumas vezes veterinários e proprietários desistem dos tratamentos e optam pela eutanásia dos animais. As propriedades profiláticas dos imunoterápicos não têm sido completamente avaliadas, assim acredita-se que a identificação de proteínas imunodominantes expressas pelo *P. insidiosum* poderia auxiliar a eficácia dos imunoterápicos já disponíveis e /ou estimular o desenvolvimento de vacinas de uso profilático.

A expressão de diferentes antígenos imunodominantes em isolados de *P. insidiosum* provenientes de diferentes espécies demonstrada por MENDOZA et al. (1992); VANITTANAKOM et al. (2004); LEAL et al. (2005); PEREZ et al. (2005); KRAJAEJUN et al. (2006) e CHINDAMPORN et al. (2009) evidenciam a presença de prováveis proteínas imunogênicas em *P. insidiosum* e sugerem a existência de variabilidade antigênica deste micro-organismo. Somado a esses achados, a ocorrência de proteínas que não foram expressas em isolados de equinos e humanos em 59 amostras de *P. insidiosum* isoladas de ambientes aquáticos por SUPABANDHU et al (2007) reafirmam a variabilidade antigênica do *P. insidiosum*. A partir desses achados vislumbra-se a probabilidade da

ocorrência de proteínas imunogênicas que possam ter atividade profilática ou que venham incrementar os métodos de imunoterapia já disponíveis. No Brasil, onde a pitiose é endêmica, apenas LEAL et al (2005) avaliaram o perfil proteico de um isolado de *P. insidiosum*. Sendo assim, é urgente o desenvolvimento de estudos que avaliem a antigenicidade desse importante patógeno.

O objetivo deste estudo é avaliar o perfil proteico de isolados de *P. insidiosum* de diferentes regiões do Brasil e identificar proteínas imunodominantes para o desenvolvimento de insumos aplicados em métodos preventivos e de diagnóstico da pitiose no Brasil.

2. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados 18 isolados de *P. insidiosum* oriundos de lesões clínicas de equinos. Todas as amostras foram previamente caracterizadas morfológicamente e molecularmente (AZEVEDO et. al, 2012).

Para a preparação do antígeno, os isolados foram cultivados em frascos tipo Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo Sabouraud, incubados a 37°C em agitação constante a 150 rpm durante 5 dias. Após incubação, as culturas foram inativadas pela adição de timerosal (0,02%/volume) e posteriormente filtradas para separação do micélio. A massa miceliana obtida foi transferida para um almofariz e macerada na presença de nitrogênio líquido até obtenção de um pó. O pó resultante foi ressuspense em 5mL de água destilada estéril, sendo a preparação antigênica utilizada no mesmo dia. Imediatamente procedeu-se a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando-se a técnica descrita por CHINDAMPORN et al (2009). A massa molecular foi estimada pela comparação com o marcador padrão de peso molecular (Bio-Rad Laboratories). Para o *western-blott*, as proteínas separadas em gel de poliacrilamida foram eletroforeticamente transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 micras), as quais foram bloqueadas com solução de PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente e posteriormente incubadas como soro equino positivo para pitiose diluído 1:1000, ficando incubados a temperatura ambiente durante 1 hora em agitação. Após 3 lavagens em PBS-T, as membranas foram incubadas durante 1 hora com IgG anti-espécie marcado com peroxidase (conjugado anti-equino - Sigma Chemical Co) diluído 1:6000. Após lavagem, a reação foi detectada pela exposição da membrana a um substrato luminescente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dezoito isolados de *P. insidiosum* corados com *commassie brilliant blue* mostraram perfis similares no SDS-PAGE. A maioria das bandas variaram de 100 kDa a 25 kDa. O perfil proteico no SDS-PAGE dos isolados avaliados foi similar ao de outros estudos (MENDOZA et al., 1992; LEAL et al., 2005; CHINDAMPORN et al., 2009; KRAJAEJUN et al., 2006; VANITTANAKOM et al., 2004). No *western blott*, o soro equino positivo para pitiose reconheceu no mínimo 8 antígenos nos isolados avaliados. A maioria dos antígenos detectados por este soro variou em peso molecular de 70KDa a 25 KDa. Porém, os antígenos com pesos moleculares de 34-37KDa, ~ 45KDa e 50 KDa pareceram ser imunodominantes. Estudos realizados por análises de *western blott* têm mostrado que anticorpos nos soros de espécies hospedeiras

infectadas por *P. insidiosum* reconhecem várias proteínas proeminentes expressas por esse agente (CHINDAMPORN et al., 2009). Em equinos, MENDOZA et al. (1992) identificou três antígenos imunodominantes com pesos moleculares de 32, 30 e 28 KDa e LEAL et al. (2005) relataram a presença de antígenos com pesos moleculares de 33,5; 38-40 e 80 KDa. Já CHINDAMPORN et al. (2009) encontraram imunógenos de 124, 74, 51, 34, 32 e 28 KDa. Avaliando-se os padrões de bandas relatados por esses autores evidencia-se que os antígenos imunodominantes observados nos isolados avaliados no presente estudo diferem em alguns antígenos. Estas diferenças podem ser decorrentes da metodologia utilizada para o desenvolvimento das técnicas de SDS-PAGE e *western blott* ou por variações geográficas dos isolados, como sugerido por CHINDAMPORN et al. (2009). Dentre os antígenos relatados, cabe ressaltar aqueles com pesos moleculares na faixa de 30-38 kDa, os quais foram expressos pela maioria dos isolados de *P. insidiosum* avaliados neste estudo e nos anteriores (MENDOZA et al., 1992; LEAL et al., 2005; CHINDAMPORN et al., 2009). Também se chama atenção para a proteína com peso molecular de ~50 kDa identificada em nossos isolados e nos avaliados por CHINDAMPORN et al. (2009). Esta proteína foi somente reconhecida por anticorpos presentes nos soros de animais infectados, não sendo identificada em soro de pacientes humanos com pitiose (CHINDAMPORN et al., 2009).

Em continuidade a este estudo preliminar, um número maior de isolados de *P. insidiosum* será incluído, bem como, um maior número de amostras de soros de equinos e de outras espécies animais, como caninos e coelhos.

4. CONCLUSÃO

Os isolados avaliados apresentam um perfil proteico similar com expressão de prováveis antígenos imunodominantes. O estudo do perfil proteico com o reconhecimento e futura caracterização de possíveis proteínas imunógenas em *P. insidiosum* é necessário para auxiliar na implementação de medidas de controle da pitiose em mamíferos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, M. I.; PEREIRA, D.I.B.; BOTTON, S. A.; COSTA, M. M.; MAHL, C.D.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J.M.. *Pythium insidiosum*: Morphological and molecular identification of Brazilian isolates. **Pesq. Vet. Bras**, v. 32, n. 7, p. 619-622, 2012.

CHINDAMPORN et al. Antibodies in the sera of host species with pythiosis recognize a variety of unique immunogens in geographically divergent *Pythium insidiosum* strains. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 16, n.3, p. 330-336, 2009.

GAASTRA, W., LIPMAN, L.J.A., DE COCK, A.W.A.M., EXEL, T.K., PEGGE, R.B.G., SCHEUWATER, J., VILELA, R., MENDOZA, L., 2010. *Pythium insidiosum*: An overview. **Vet. Microbiol.** 146, 1- 16.

KRAJAEJUN, T. et al. Identification of a novel 74-kilodalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 5, p. 1674-1680, 2006

LEAL, A.T. et al. Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 15, p. 63-68, 2005.

MENDOZA, L.; NICHOLSON, V.; PRESCOTT, J.F. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, n. 11, p. 2980-2983, 1992

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *P. insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

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

SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**. v. 46, n.1, p. 46-51, 2007.

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