

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNODOMINANTES EM ISOLADOS BRASILEIROS DE *Pythium insidiosum*

BEATRIZ PERSICI MARONEZE¹; JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA²; RÔMULO SILVA
DE OLIVEIRA³; FERNANDO DE SOUZA MAIA FILHO⁴; VANESSA DAL BEN⁵;
DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas- RS- beatrizpersici@gmail.com;

² Universidade Federal de Pelotas - RS - juliassilveira@gmail.com;

³ Universidade Federal de Pelotas- RS - deoliveira.romulo@gmail.com;

⁴ Universidade Federal de Pelotas - RS- fmaia2404@yahoo.com.br;

⁵ Universidade Federal de Pelotas- RS - nessadalben@hotmail.com;

⁶ Universidade 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). O gênero *Pythium* agrega várias espécies sapróbias ou patógenas que utilizam ambientes aquáticos para o desenvolvimento de seu ciclo biológico (Mendoza et al., 1996). Por isso, a pitiose está relacionada ao contato das espécies suscetíveis com águas contaminadas por zoósporos móveis (forma infectante) produzidos pelo agente.

O prognóstico da doença é desfavorável para todas as espécies afetadas podendo levar 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. Devido ao tratamento prolongado e seu efeito curativo lento, 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 21 isolados de *P. insidiosum* oriundos de lesões clínicas de equinos. Todas as amostras foram previamente caracterizadas morfológica 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 ressuspenso 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 eletroforéticamente 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

Vinte e um 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, 50 KDa e 75 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 CHINDANPORN 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 blot* 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). Adicionalmente, chama-se atenção para as proteínas com pesos moleculares de ~50kDa e ~74KDa identificadas em nossos isolados e nos avaliados por CHINDAMPORN et al. (2009). Esses autores relataram que a proteína de ~50 kDa 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). Por outro lado, nesse mesmo estudo foi evidenciado que a proteína de ~74 KDa reagiu fortemente com soro de pacientes humanos e fracamente com soro de equinos com pitiose. Estes encontros sugerem que os hospedeiros reconhecem e respondem imunologicamente a antígenos diferentes expressos por *P. insidiosum*.

Em continuidade a este estudo estas amostras devem ser testadas quanto a um maior número de amostras de soros de equinos e de outras espécies animais, como caninos e coelhos.

4. CONCLUSÕES

Os isolados avaliados apresentam um perfil proteico similar com expressão de prováveis antígenos imunodominantes, os quais servirão para o desenvolvimento de vacinas e insumos para testes de diagnóstico da pitiose em futuros estudos.

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.