

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós - Graduação em Parasitologia



Tese

**Perfil proteico de isolados brasileiros de *Pythium insidiosum* e detecção de
anticorpos em equinos clinicamente sadios**

Vanessa Dal Ben

Pelotas, 2018

Vanessa Dal Ben

**Perfil proteico de isolados brasileiros de *Pythium insidiosum* e detecção de
anticorpos em equinos clinicamente sadios**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (área de conhecimento: Parasitologia).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B456p Dal Ben, Vanessa

Perfil proteico de isolados brasileiros de *Pythium insidiosum* e detecção de anticorpos em equinos clinicamente sadios / Vanessa Dal Ben ; Daniela Isabel Brayer Pereira, orientadora. — Pelotas, 2018.

60 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Pitiose. 2. Proteínas. 3. Anticorpos. 4. Western blot.
5. Elisa. I. Pereira, Daniela Isabel Brayer, orient. II. Título.

CDD : 612.11822

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Vanessa Dal Ben

Perfil proteico de isolados brasileiros de *Pythium insidiosum* e detecção de anticorpos em equinos clinicamente sadios

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 21/05/2018

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Daniela Isabel Brayer Pereira (Orientadora)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite.
Doutor em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin-Madison, Estados Unidos

Prof.^a Dr.^a Sônia de Avila Botton.
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof.^a Dr.^a Daiane Drawanz Hartwig.
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr.^a Cristina Gomes Zambrano.
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas

**À minha família,
em especial ao meu pai,
Sergio Luiz Dal Ben,
"in memorian".**

Agradecimentos

Agradeço,

A Deus por ter me dado forças para concluir o meu trabalho.

Aos meus pais, Maria da Graça Silveira Miranda e Sergio Luiz Dal Ben, por sempre me apoiarem e me incentivarem a estudar para ser alguém melhor.

Ao meu marido Luciano Reis de Oliveira, pelo apoio e palavras de conforto nos momentos difíceis.

As minhas amigas e colegas, pela amizade, ajuda e conversas.

A minha orientadora Daniela Isabel Brayer Pereira, pelo ensinamento, dedicação e incentivo.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) por me proporcionar a realização da Pós-graduação, em nível de mestrado e doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da UFPEL e todos os professores que contribuíram para a minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão da minha tese.

Muito obrigada!

Resumo

DAL BEN, Vanessa. **Perfil proteico de isolados brasileiros de *Pythium insidiosum* e detecção de anticorpos em equinos clinicamente sadios.** 2018. 60f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Pythium insidiosum é o agente causador da pitiose, uma doença emergente de difícil tratamento. Apresenta distribuição mundial, entretanto, no Brasil é considerada endêmica em regiões como o Pantanal Mato-grossense e Rio Grande do Sul. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil proteico de isolados brasileiros de *P. insidiosum*, bem como detectar os anticorpos IgG anti-*P. insidiosum* em equinos clinicamente sadios para pitiose. Primeiramente, os isolados de *P. insidiosum* de origem equina e canina foram analisados por SDS-PAGE e *Western blot*. Utilizou-se soros de equino, bovino e canino naturalmente infectados e coelho experimentalmente infectado para a detecção das proteínas deste micro-organismo. Foram observadas proteínas de 100 a 20 KDa através do SDS-PAGE. Os isolados oriundos de equinos e caninos evidenciaram perfil proteico semelhante. Os anticorpos anti-*P. insidiosum* presentes nos soros dos animais avaliados reconheceram as proteínas de ~50-55 KDa e ~34 KDa como imunodominantes. Adicionalmente, proteínas de ~74 KDa e ~30 KDa foram reconhecidas com menor intensidade pelos anticorpos dos animais testados. Os resultados demonstraram que os isolados brasileiros de *P. insidiosum* estudados apresentam um perfil proteico similar. A segunda etapa do presente estudo foi avaliar o perfil de anticorpos anti-*P. insidiosum* no soro de equinos clinicamente sadios para pitiose. Foi realizado o teste de ELISA indireto, o qual detectou 6,18% (56/906) igual/ou superior ao cut-off (OD=0,349) para pitiose equina. Adicionalmente, foram selecionados os soros (06/56) que apresentaram títulos de anticorpos específicos anti-*P. insidiosum* acima do cut-off para a realização da técnica de *Western blot*. Evidenciou-se as proteínas de massas moleculares de ~50-55 KDa e ~34 KDa fortemente marcadas, e ~74 KDa com menor intensidade. Contudo, nos testes evidenciaram-se baixos títulos de anticorpos anti- *P. insidiosum*, todavia, uma resposta imunológica foi desencadeada devido à presença de proteínas imunodominantes. Sugere-se que os equinos estiveram em contato prévio com o agente etiológico da pitiose.

Palavras-chave: pitiose; proteínas; anticorpos; *Western blot*; ELISA.

Abstract

DAL BEN, Vanessa. **Protein profile of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* and detection of antibodies in clinically healthy horses.** 2018. 60f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Pythium insidiosum is the causative agent of pythiosis, an emerging disease of difficult treatment. It presents worldwide distribution, however, in Brazil it is considered endemic in regions such as the Pantanal Mato Grosso and Rio Grande do Sul State. The present study aimed to evaluate the protein profile of Brazilian isolates of *P. insidiosum*, as well as to investigate the profile of anti-*P. insidiosum* IgG antibodies in clinically healthy horses for pythiosis. Firstly, isolates of *P. insidiosum* of equine and canine origin were analyzed by SDS-PAGE and *Western blot* analysis. Naturally infected equine, bovine and canine sera and experimentally infected rabbit were used to detect the proteins of this microorganism. Several proteins of 100 to 20 KDa were observed through SDS-PAGE. Isolates from equines and canines showed a similar protein profile. Anti-*P. insidiosum* antibodies present in the sera of the evaluated animals showed proteins of ~ 50-55 KDa and ~34 KDa as immunodominants. Additionally, ~ 74 KDa and ~ 30 KDa proteins were poorly recognized by antibodies of the animals evaluated. The results showed that the Brazilian isolates of *P. insidiosum* studied showed a similar protein profile. The second step of the present study was to evaluate the anti-*P. insidiosum* antibody profile in serum of clinically healthy horses for pythiosis. An indirect ELISA test was performed, which detected 6.18% (56/906) equal to or greater than cut-off (OD = 0.349) for equine pythiosis. In addition, sera (06/56) containing anti-*P. insidiosum* specific antibody titres were selected above the cut-off for performing the *Western blot* technique. Molecular weight proteins of ~ 50-55 KDa and ~ 34 KDa strongly labeled, and ~ 74 KDa with lower intensity were shown. However, in the tests it was possible to evident low titers of anti-*P. insidiosum* antibodies, but an immune response was elicited due to the presence of immunodominant proteins. It is suggested that the clinically healthy horses were in previous contact with the etiological agent of the pythiosis.

Keywords: pythiosis; proteins; antibodies; *Western blot*; ELISA.

Lista de Figuras

Figura 1 Hipótese do mecanismo imunológico desencadeado na pitiose equina..... 20

Artigo 1

Figure 1 SDS-PAGE profiles of proteins from *Pythium insidiosum*. MW: molecular weight marker: 100, 75, 50, 37, 25 and 20 KDa. Pi: *Pythium insidiosum* isolates from horse. Pi* (Pi 22 and Pi 23): *Pythium insidiosum* isolates from dog. Asterisks, overexpressed proteins (~50-55 KDa and ~30-34 KDa) and putative immunodominant antigens found on almost all WB membranes; arrows, weakly expressed proteins (~100, ~74 and ~20 KDa). The gels were stained with Coomassie brilliant blue..... 31

Figure 2 Western blot analysis of serum sample from horse (A), cattle (B), dog (C) and rabbit (D) with pythiosis. MW: molecular weight marker: 75, 50, 37 e 25 KDa. Pi: *Pythium insidiosum* isolates from horse. Pi* (Pi 22 and Pi 23): *Pythium insidiosum* isolates from dog. CS: control serum; Asterisks, the ~50-55 KDa and ~34 KDa immunodominant antigens; arrows, the ~74 KDa, ~60KDa, ~30KDa and ~24 KDa antigens..... 33

Lista de Tabelas

Artigo 1

Table 1	<i>Pythium insidiosum</i> isolates used in this study ($n = 22$) and their corresponding information including: host (species, years old, and sex), geographical origin, location of lesion, treatment, and outcome of pythiosis.....	30
Table 2	Protein profile of Brazilian <i>Pythium insidiosum</i> isolates ($n = 22$) from equines and canines naturally infected.....	32

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 Revisão bibliográfica	14
3.1 Oomicetos.....	14
3.2 <i>Pythium insidiosum</i>.....	15
3.3 Pitiose	17
3.4 Imunologia da pitiose	19
3.5 Diagnóstico.....	22
3.6 Tratamento.....	24
4 Artigo 1.....	27
Introduction	29
Methods	29
Results	31
Discussion.....	33
Conclusion	34
References.....	34
5 Manuscrito 1	36
Introdução	37
Material e Métodos.....	38
Resultados.....	40
Discussão	40
Conclusão.....	42
Referências.....	43
6 Conclusões gerais	47
Referências	48
Anexos	57

1 Introdução

A pitiose é causada por um importante oomiceto aquático denominado *Pythium insidiosum*, pertencente ao reino Stramenopila, classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae, gênero *Pythium* e espécie *insidiosum* (ALEXOPOULOS et al. 1996; GAASTRA et al. 2010).

Trata-se de uma doença emergente e de difícil tratamento (GAASTRA et al. 2010). É prevalente em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, em locais alagadiços e pantanosos (MILLER, 1983; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; GAASTRA et al. 2010).

A pitiose tem sido frequentemente relatada em mamíferos, atingindo principalmente equinos, caninos e o homem. No Brasil, a doença foi descrita em equinos (MARCOLONGO-PEREIRA et al. 2012), caninos (FERNANDES et al. 2012), bovinos (GRECCO et al. 2009) , ovinos (TABOSA et al. 2004), caprinos (DO CARMO et al. 2015) e humanos (BOSCO et al. 2005). A maioria dos casos clínicos descritos relata o acesso dos animais afetados a ambientes com águas paradas em lagos, açudes e pântanos (CHAFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995).

O diagnóstico da enfermidade é realizado através da microscopia, cultura, detecção de anticorpos e técnicas moleculares (AZEVEDO et al. 2012; GROOTERS; GEE, 2002; KRAJAEJUN et al. 2004, 2009; PANNANUSORN et al. 2007). Diversas técnicas sorológicas foram desenvolvidas para a detecção de anticorpos contra *P. insidiosum*, destacando-se a metodologia de ELISA (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; MENDOZA et al. 1997; SANTURIO et al. 2006b; CHAREONSIRISUTHIGUL et al. 2013) e Western blot (MENDOZA et al. 1992; KRAJAEJUN et al. 2006; CHINDAMPORN et al. 2009). Convém salientar que ambos os métodos apresentam desempenho e sensibilidade em torno de 90% para a detecção de anticorpos e proteínas deste oomiceto (KRAJAEJUN et al. 2002;

SANTURIO et al. 2006b; CHAREONSIRISUTHIGUL et al. 2013; MENDOZA; VILELLA, 2013).

O tratamento da pitiose é difícil pelas peculiaridades do micro-organismo. A ausência de ergosterol em sua membrana citoplasmática, explica a pouca suscetibilidade de *P. insidiosum* aos fármacos antifúngicos (FOIL, 1996; GAULIN et al. 2010; GROOTERS, 2003). Por outro lado, a imunoterapia é considerada uma prática segura, com índices de cura de aproximadamente 60-70% em equinos e humanos, entretanto, muitos casos não apresentam respostas e em algumas espécies os resultados são desapontadores (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Diversos estudos têm evidenciado a expressão de diferentes抗ígenos imunodominantes em isolados de *P. insidiosum*, provenientes de diferentes hospedeiros, sugerindo a existência de variabilidade antigênica deste micro-organismo (MENDOZA et al. 1992; VANITTANAKON et al. 2004; LEAL et al. 2005; PÉREZ et al. 2005; KRAJAEJUN et al. 2006; CHINDAMPORN et al. 2009).

No Brasil, Leal et al. (2005) demonstraram a presença de diferentes抗ígenos imunodominantes ao avaliar um isolado de *P. insidiosum* brasileiro. Observaram que os anticorpos no soro dos equinos avaliados reconheceram as proteínas de 80, 39 e 33,5 KDa, as quais foram similares aos coelhos infectados experimentalmente, todavia os bovinos reconheceram as proteínas de 70, 39-40 e 35 KDa, sugerindo diferentes perfis proteicos. Contudo, espécies diferentes podem desencadear resposta imunológica específica a diferentes抗ígenos (PÉREZ et al. 2005). Na Tailândia foi realizado um estudo com pacientes humanos, e através da técnica de *Western blot* detectaram a proteína de 74 KDa, considerada imunodominante (KRAJAEJUN et al. 2006). Posteriormente, esta proteína foi caracterizada e identificada como sendo uma exo-1,3-β-glucanase (KRAJAEJUN et al. 2010). Entretanto, a descoberta de proteínas específicas com a capacidade de induzir uma resposta imune diferenciada, a fim de entender a patogenia, ainda requer algumas análises. Posteriormente, Chindamporn et al. (2009) avaliou isolados de *P. insidiosum* oriundos das Américas e demonstraram a presença de proteínas imunodominantes em soros equinos e bovinos de 51-49, 34 e 28 KDa.

Diante do exposto, ressalta-se que são incipientes os estudos avaliando o perfil proteico dos isolados brasileiros de *P. insidiosum*. Dessa maneira, a identificação e caracterização das proteínas imunodominantes tornam-se

importantes para esclarecer a resposta imunológica da pitiose e melhor entender os mecanismos de patogenicidade deste micro-organismo, como também auxiliar na profilaxia desta enfermidade. Neste sentido, o conhecimento destes antígenos imunogênicos pode ser utilizado para aprimorar métodos de imunoterapia existentes, assim como desenvolver novos tratamentos e testes para o diagnóstico da pitiose.

Observa-se que num mesmo ambiente contaminado com *P. insidiosum* nem todos os animais expostos são infectados, havendo uma suscetibilidade individual ao desenvolvimento da enfermidade. No entanto, acredita-se que a resposta imune possa ser um dos mecanismos envolvidos no processo de aquisição da doença. Previamente, Miller e Campbell (1982) e Weiblen et al. (2016) sugeriram que o estímulo antigênico de *P. insidiosum* resultante da exposição a ambientes contaminados pode induzir uma resposta imune, baseados na presença de equinos sadios soro-reagentes em ensaios imunológicos.

Todavia, estudos avaliando a resposta imune de animais sadios e expostos a ambientes com *P. insidiosum* não foram realizados e são importantes para entender se a exposição ao agente é capaz de induzir uma reposta imunológica. Acredita-se que avaliando esse perfil imunológico, pode-se entender alguns aspectos da interação patógeno-hospedeiro, bem como determinar a participação dessa resposta na proteção do hospedeiro às infecções por *P. insidiosum*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil proteico de isolados brasileiros de *P. insidiosum*, bem como detectar anticorpos IgG anti-*P. insidiosum* em equinos clinicamente sadios para pitiose.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o perfil proteico de isolados brasileiros de *P. insidiosum* de origem equina e canina;
- Identificar as proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* em diferentes espécies de animais, tais como, equino, canino, bovino e coelho;
- Detectar anticorpos anti-*P. insidiosum* em soro de equinos sem sinais clínicos de pitiose;
- Detectar as proteínas imunodominantes em equinos sem sinais clínicos de pitiose.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Oomicetos

Estudos sobre a classificação fúngica, empregando a análise filogenética e análises moleculares dividiram os organismos classificados como fungos em três reinos: Fungi, Stramenopila e Protista (ALEXOPOULOS et al. 1996).

Os oomicetos embora classificados no reino Stramenopila, parecem morfologicamente com os fungos verdadeiros, porém, geneticamente estão mais relacionados aos organismos aquáticos, como as algas marrons e diatomáceas (ADHIKARI et al. 2013). Segundo Santurio et al. (2006a), a desigualdade taxonômica entre os oomicetos e os fungos foi demonstrada através das diferenças na parede celular e na composição da membrana citoplasmática. A parede celular dos oomicetos é composta por traços de celulose e β-glucanas, não apresentando quitina, o constituinte principal da parede celular fúngica (HENDRIX, 1964). Mesmo sendo um micro-organismo filamentoso, apresenta algumas alterações na sua composição, como a ausência do ergosterol, principal esteroide na membrana citoplasmática dos fungos (GROOTERS, 2003).

Embora alguns oomicetos sejam sapróbios, outros são patogênicos e podem infectar uma grande variedade de hospedeiros. Estes micro-organismos têm sido relatados por infectar plantas (*Pythium spp* e *Phytophthora spp*), insetos (*Lagenidium spp* e *Pythium spp*), peixes (*Achlya spp*, *Saprolegnia spp* e *Pythium spp*), aves (*P. insidiosum*) e mamíferos (*Lagenidium spp* e *Pythium spp*) (MENDOZA; VILELLA, 2013).

3.2 *Pythium insidiosum*

No decorrer dos anos, a classificação e a taxonomia de *P. insidiosum*, bem como a nomenclatura da pitiose sofreram diversas modificações. No início do século XX, dois cientistas alemães notificaram os primeiros registros de isolamento deste agente, destacando o aparecimento de granulomas subcutâneos em equinos (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Entretanto, a sua identificação foi realizada apenas em 1961, recebendo o nome de *Hyphomyces destruens* (BRIDGES; EMMONS, 1961). Em 1974, Austwick & Copland, verificaram a possibilidade do micro-organismo em produzir zoósporos biflagelados, tornando-se parte do gênero *Pythium*. Posteriormente De Cock et al. (1987), ao analisar isolados de equinos, caninos, bovinos e humanos de localidades distintas, concluíram que se tratava do mesmo micro-organismo, sendo então denominado *P. insidiosum*. No entanto, somente em 1989 foi estabelecida a nomenclatura definitiva do agente da pitiose como *P. insidiosum* (MENDOZA; MARIN, 1989). Segundo a última classificação, o agente etiológico da pitiose pertence ao reino Stramenopila, filo Oomycota, classe Oomycetes, família Pythiaceae, gênero *Pythium* e espécie *insidiosum* (ALEXOPOULOS et al. 1996).

O gênero *Pythium* comprehende mais de 250 espécies descritas, porém aproximadamente 140 são aceitas pela comunidade científica, abrangendo patógenos de mamíferos, plantas, micoparasitas, algas e espécies sapróbias. São encontrados em água doce, salgada e ambiente terrestre (KAGEYAMA, 2014).

As espécies de *Pythium* apresentam diferenças genéticas e demonstram diversidade em termos de virulência, hospedeiro e distribuição (ADHIKARI et al. 2013). Algumas espécies são utilizadas para controle biológico de fungos patógenos e larvas de mosquitos (SANTURIO et al. 2006a). No entanto, a espécie *P. insidiosum* durante anos foi considerada a única patogênica em mamíferos (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Todavia, após 2011, surgiram relatos sobre a espécie *Pythium aphanidermatum*, a qual também demonstrou patogenicidade causando lesões cutâneas em dois soldados do Afeganistão (CALVANO et al. 2011; FARMER et al. 2015).

Por integrar o filo Oomycota, *P. insidiosum* apresenta as seguintes particularidades: talo diplóide, ocorrência de reprodução sexuada oogâmica e

reprodução assexuada com a produção de zoósporos biflagelados, mitocôndria com crista tubular e rota alternativa para a síntese do aminoácido lisina (MOORE-LANDECKER, 1996; ALEXOPOULOS et al. 1996).

P. insidiosum apresenta crescimento nas temperaturas de 20-37°C, todavia os isolados mantidos a 37°C apresentam crescimento mais rápido, em torno de 4 horas (ZAMBRANO et al. 2017). Segundo Santurio et al. (2006a), os isolados deste agente podem ser identificados pelo aspecto da colônia e pelas características das hifas. O cultivo pode ser feito em diversos meios de cultura e incubado a 25 ou 37°C, entre eles, agar Sabouraud com o crescimento de colônias brancas ou hialinas e padrão irregular (WITKAMP, 1924, 1925; DE COCK et al. 1987) e agar farinha de milho (CMA) no qual ocorre crescimento de colônias esbranquiçadas ou transparentes e curto micélio aéreo (DE COCK et al. 1987; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Apresenta hifas cenocíticas, septos raramente observados, que variam entre 4 e 10µm com ramificações perpendiculares laterais em ângulo reto (DE COCK et al. 1987; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). A identificação morfológica preconiza a indução da reprodução assexuada *in vitro* através do cultivo deste agente em agar e incubação em solução rica em sais minerais (MENDOZA; PRENDAS, 1988). Para a classificação final da espécie, a utilização de técnicas moleculares, como a PCR e o sequenciamento de DNA, torna-se de extrema importância, mesmo quando as características morfológicas permitam a identificação de *P. insidiosum* (GROOTERS; GEE, 2002; BOTTON et al. 2011).

Segundo Miller (1983), o ciclo biológico do agente *P. insidiosum* inicia-se pela colonização de plantas aquáticas, utilizadas como substrato para seu desenvolvimento e sua reprodução, formando os zoosporângios. Os zoósporos liberados na água movimentam-se até encontrar outra planta, onde se encistam e emitem o tubo germinativo, originando um novo micélio e concluindo seu ciclo. O contato dos animais com esses ambientes é a provável fonte de infecção. Estudos demonstram que ocorre quimiotaxia dos zoósporos para pelos e tecidos de animais e vegetais, porém, a ocorrência da pitiose depende da imunidade do hospedeiro (MENDONZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Frequentemente, observa-se que os animais acometidos permanecem por longos períodos em contato com águas paradas em lagos, açudes ou locais pantanosos (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995).

3.3 Pitiose

A pitiose afeta mamíferos e apresenta-se nas formas cutâneas/subcutâneas em equinos, caninos, felinos, bovinos, ovinos, caprinos, na forma gastrointestinal em caninos e felinos ou na forma ocular, subcutânea e sistêmica no homem (GAASTRA et al. 2010, DO CARMO et al. 2015).

A enfermidade apresenta distribuição mundial, destacando-se em áreas pantanosas de regiões de clima tropical, subtropical e temperado. Relatos da doença são frequentes no sudeste da Ásia, Austrália, Nova Zelândia, África e Américas (Sul, Central e Norte) (GAASTRA et al. 2010).

No Brasil, a pitiose em equinos é considerada endêmica nas regiões do Pantanal (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTOS et al. 2014) e no Rio Grande do Sul (MARCOLONGO-PEREIRA et al. 2012; WEIBLEN et al. 2016), com prevalências de 12,5% a 14,5%, respectivamente. No entanto, essa enfermidade também foi descrita em outros animais como caninos, ovinos, bovinos e caprinos (SANTURIO et al. 2006a; DO CARMO et al. 2015). Adicionalmente, um caso de pitiose subcutânea foi relatado em humano (BOSCO et al. 2005).

O acúmulo de água em banhados e temperaturas entre 30°C e 40°C parecem ser fatores essenciais que influenciam a produção de zoósporos proporcionando a ocorrência da enfermidade (MILLER; CAMPBELL, 1982). Torna-se importante destacar que a presença de zoósporos no ambiente é o fator determinante para a infecção, não ocorrendo registros de transmissão direta entre animais e entre animais e o homem, nem mesmo predisposição por idade, sexo ou raça (MENDONZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTURIO et al. 2006a).

O período de incubação da doença não está bem definido, podendo variar de alguns dias a várias semanas (MILLER; CAMPBELL, 1982; TABOSA et al. 1999; SALLIS et al. 2003). Alfaro e Mendoza (1990) citam que dois dias após a penetração do zoósporo na pele, pode-se observar um aumento de volume da região de 5 mm (milímetros) de diâmetro que aumenta rapidamente, podendo atingir 10 a 20 cm (centímetros) em duas semanas.

A enfermidade em equinos caracteriza-se pelo aparecimento de lesões ulcerativas com rápida evolução, formando grandes massas teciduais de bordas irregulares e aparência tumoral. Atinge principalmente as extremidades distais dos

membros e porção ventral da parede toraco-abdominal, devido ao maior contato com água contaminada por zoósporos (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996).

No interior da lesão, ocorre a formação de massas branco-amareladas semelhantes a corais, com aspecto arenoso, ramificado e irregular, denominadas *kunkers* (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Ressalta-se que os *kunkers* formam-se especificamente em equinos, sendo ausentes nas outras espécies afetadas pela pitiose (LEAL et al. 2001; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; MENDOZA, 2005). Estas estruturas, além de representar um papel significativo para o diagnóstico, também podem atuar como contaminantes em águas, visto que conseguem se desprender facilmente da lesão e, contando com o ambiente favorável e água parada, reproduzem novamente o ciclo do oomiceto colonizando novas plantas e mantendo a recontaminação do ambiente (FONSECA et al. 2014).

Os caninos são a segunda espécie mais afetada pela pitiose. Nesta espécie a enfermidade apresenta-se como lesões cutâneas ou na forma gastrointestinal (SANTURIO et al. 2006a). A maioria dos casos manifesta-se na forma gastrointestinal, sendo caracterizada por grandes massas nas paredes do estômago e intestino que levam a obstrução da luz do órgão, assim como distúrbios digestivos, perda de peso, anorexia e diarreia (GROOTERS, 2003; SANTURIO et al. 2006a).

A pitiose em bovinos é esporádica (SANTURIO et al. 1998; PÉREZ et al. 2005; GABRIEL et al. 2008; GRECCO et al. 2009); entretanto, nesta espécie a infecção é autolimitante (SANTURIO et al. 1998, GRECCO et al. 2009). Autores relataram a pitiose cutânea em bovinos, no Rio Grande do Sul, descrevendo que os animais adquiriram a doença durante o verão, apresentando lesões cutâneas em regiões do corpo que estiveram em contato com águas de regiões pantanosas e alagadiças (GABRIEL et al. 2008; GRECCO et al. 2009).

Nas demais espécies como ovinos (TABOSA et al. 2004), caprinos (DO CARMO et al. 2015), felinos (BISSONNETTE et al. 1991; RAKICH et al. 2005) e outros mamíferos selvagens (CAMUS; GROOTERS; AQUILAR, 2004; VIDELA et al. 2012), a pitiose é pouco frequente e geralmente desenvolve-se nas formas cutâneas/subcutâneas.

A infecção por *P. insidiosum* em humanos, manifesta-se de três formas:

cutânea, ocular e sistêmica (TRISCOTT et al. 1993; IMWIDTHAYA, 1994; SHENEP et al. 1998; SUDJARITRUCK; SIRISANTHANA, 2011; KEOPRASOM et al. 2012). Na Tailândia, encontra-se a maioria dos casos relatados e a doença é considerada endêmica, ocorrendo elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Esta infecção tem sido associada com a síndrome de α e β-talassemia, frequente nesta região (KRAJAEJUN et al. 2006).

Os coelhos são utilizados como modelo experimental para a pitiose. A suscetibilidade à infecção foi verificada nesta espécie através da inoculação subcutânea de água infectada por zoósporos (MENDOZA; NEWTON, 2005). Ocorre o aparecimento de nódulos subcutâneos, que evoluem para fibrogranulomas eosinofílicos após 20-30 dias de inoculação (MILLER; CAMPBELL, 1983). Os estudos vêm utilizando coelhos como modelo experimental para avaliar imunoterapias (SANTURIO et al. 2003; PEREIRA et al. 2008) e terapias antifúngicas (PEREIRA et al. 2007; LORETO et al. 2011; ARGENTA et al. 2012; ZANETTE et al. 2015; FONSECA et al. 2015b).

3.4 Imunologia da pitiose

Apesar do progresso nos estudos sobre a doença e imunoterapia, é importante ressaltar que, ainda, não há um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos na infecção por *P. insidiosum*. As explicações para os mecanismos de infecção e de cura são baseados em hipóteses suportadas por observações da doença em humanos e equinos (SANTURIO et al. 2006a).

O caráter progressivo da doença em equinos imunocompetentes sugere a ocorrência de uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio que impede o sistema imunológico de responder à infecção (MILLER, 1981). As hifas, mesmo sendo antigênicas, não são completamente reconhecidas pelas células imunológicas do hospedeiro, devido à marcante reação inflamatória, particularmente eosinofílica, que recobre a superfície das hifas, impedindo a exposição dos抗ígenos requeridos para a correta estimulação antigênica (MILLER, 1981; MENDOZA et al. 2003).

Mendoza et al. (2003) propuseram um provável mecanismo imunológico envolvido na pitiose equina. Neste modelo os autores sugeriram que os zoospóros emitem tubos germinativos ao entrar em contato com a pele do hospedeiro,

penetrando nos tecidos. A partir da infecção tecidual, as hifas liberam exoantígenos reconhecidos pelas células apresentadoras de抗ígenos (APC), os quais estimulam as células imunes a produzir interleucina 4 (IL4) que atrai linfócitos T auxiliares (TH0). Adicionalmente, há ativação de linfócitos TH2, que por sua vez induzem a produção de IL4 e IL5. A IL4 tem a função de regular a expressão de TH1 e estimular as células B a produzir IgE, IgM e IgG, podendo ser detectadas em testes diagnósticos. A IL5 e IgE provocam a mobilização dos eosinófilos e mastócitos para o local da lesão (responsáveis pelos danos teciduais). Os eosinófilos se ligam na porção Fc da IgE e, ocorre sua degranulação, o que culmina com a proteção da hifa do sistema imune. Esse fenômeno é denominado Splendore-Hoepli (Figura 1) (MENDOZA et al. 2003).

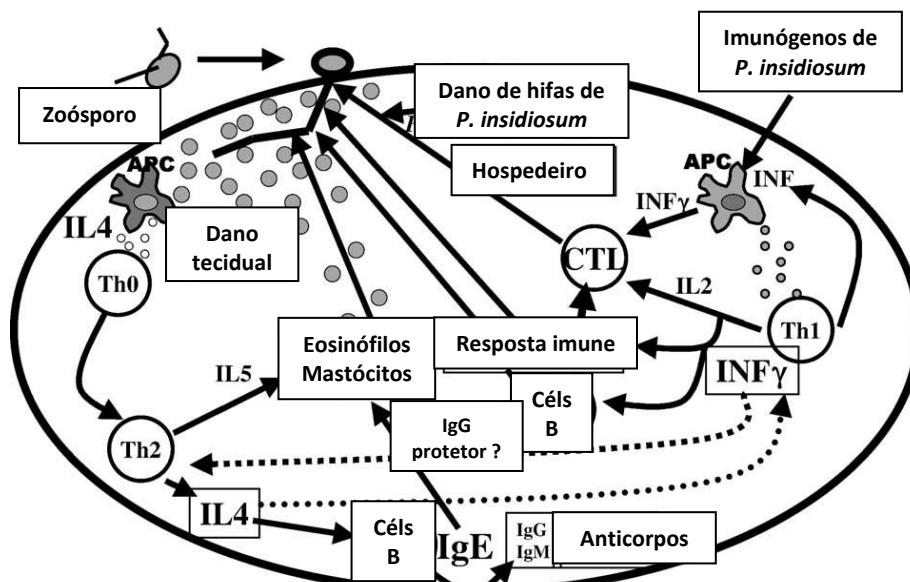


Figura 1 - Hipótese do mecanismo imunológico desencadeado na pitiose equina.

Fonte: Adaptado de Mendoza et al. (2003).

Em equinos, o fenômeno Splendore-Hoepli acontece com frequência, formando massas denominadas *kunkers*. Nota-se a multiplicação das hifas no interior dos *kunkers*, ocorrendo a produção de exoantígenos em grande quantidade. A produção constante destes exoantígenos pode desempenhar um papel na resposta imune do hospedeiro, podendo ocorrer o bloqueio de TH2 (MENDOZA et al. 2003).

Ressalta-se, que os mecanismos envolvidos na cura através da imunoterapia fundamentam-se principalmente na resposta celular, devido às alterações teciduais que aparecem após o início da cura, com mudança de inflamação eosinofílica para

uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). No entanto, em decorrência da exposição aos imunógenos presentes em imunoterápicos, há a apresentação de outros抗ígenos nas APC, tornando-se distintos daqueles presentes na infecção natural. Deste modo, as APC estimulam a liberação de interferon gama (IFN γ) que ativam TH0 para TH1. O TH1 ativado produz mais IFN γ e, também, interleucina 2 (IL2). Por sua vez, IL2 e IFN γ irão ativar mediadores de células mononucleares composta por linfócitos T e macrófagos que danificam e destroem a hifa de *P. insidiosum*. Não está claro se durante a imunoterapia, a IL2 e IFN γ também estimulariam linfócitos B para produzir IgG protetores. Acredita-se que a produção de IFN γ , no local da infecção através das APC e TH1, resulte na redução da expressão de TH2 (LEAL et al. 2001, MENDOZA et al. 2003).

Adicionalmente, o desaparecimento da resposta eosinofílica e expressão de acentuada reação mononuclear após imunoterapia, observada por Miller (1981) e Mendoza et al. (2003), associado aos altos títulos de IL4, IL5 e IgE observados em humanos com pitiose arterial e desaparecimento de seus níveis após imunoterapia, com concomitante aumento dos níveis de IL2 (WANANACHIWANAWIN et al. 2004), fortemente suportam a hipótese de resposta celular na cura. Similarmente, Mendoza et al. (2003) também encontraram baixos títulos de IgE em equinos curados após imunoterapia. Além disso, estes mesmos autores demonstraram, em estudos histopatológicos antes e após terapia, que quando se utiliza o imunoterápico, as hifas são aparentemente destruídas pela população de células mononucleares, sendo observadas como estruturas tubulares vazias, somente identificadas como hifas de *P. insidiosum* por imunofluorescência.

Adicionalmente, Inêz-Ferreira et al. (2017) realizaram uma pesquisa utilizando camundongos infectados com *Leishmania major* para avaliar o potencial imunomodulador do imunoterápico. Os camundongos produziram uma resposta TH2 como esperado e apresentaram lesões cutâneas grandes. Os camundongos foram imunizados previamente com o imunoterápico e posteriormente foram infectados com *Leishmania major*, os quais apresentaram lesões cutâneas mínimas ou ausentes. Os resultados sugeriram que as proteínas existentes no imunoterápico têm a capacidade de modular uma resposta TH2 para TH1. Isto sugere que pode afetar a resposta imune contra抗ígenos de outras infecções, assim como infecção

por *P. insidiosum*.

Adicionalmente, Ledur et al. (2017) utilizaram em seu estudo células dendríticas (DC) estimuladas com zoósporos de *P. insidiosum* inativados com o calor, (1,3) (1,6) β-glucano e o imunoterápico Pitium Vac. Os zoósporos de *P. insidiosum* inativados com o calor mostraram maior resposta TH1 entre os grupos testados, com aumento significativo de interleucina 6 (IL6) e IFNy em células humanas. Os resultados sugeriram que DC infectadas com zoósporos de *P. insidiosum* podem ser utilizadas como estratégia terapêutica no tratamento e aquisição de imunidade contra pitiose.

3.5 Diagnóstico

Durante muito tempo, o diagnóstico da pitiose baseou-se nos aspectos clínicos, histopatológicos, isolamento e identificação do oomiceto, utilizando a cultura e análises morfológicas e reprodutivas (SANTURIO et al. 2006a). Atualmente, além dos aspectos relacionados acima, os métodos sorológicos e moleculares são imprescindíveis para o correto diagnóstico e a identificação de *P. insidiosum* (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; GROOTERS, 2003; BOTTON et al. 2011; AZEVEDO et al. 2012; THONGSRI et al. 2013).

Os métodos sorológicos empregados no diagnóstico da pitiose incluem a imunodifusão, fixação do complemento, ELISA, *Western blot*, imunocromatografia e hemaglutinação (MILLER; CAMPBELL, 1982; MENDOZA et al. 1986, 1992, 1997; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTURIO et al. 2006b; CHINDAMPORN et al. 2009; KRAJAEJUN et al. 2009; CHAREONSIRISUTHIGUL et al. 2013).

Estudos demonstram que o teste de imunodifusão apresenta maior detecção de anticorpos contra *P. insidiosum* do que os testes de fixação de complemento (MILLER; CAMPBELL, 1982), porém, este teste aponta alta especificidade e baixa sensibilidade (CHAREONSIRISUTHIGUL et al. 2013). A hemaglutinação é um método rápido de detecção, todavia, apresenta baixo desempenho (CHAREONSIRISUTHIGUL et al. 2013). As técnicas que apresentam maior destaque são ELISA, *Western blot* e imunocromatografia com desempenho, sensibilidade e especificidade em torno de 90-100% (CHAREONSIRISUTHIGUL et al. 2013; MENDOZA; VILELLA, 2013).

A metodologia de ELISA é considerada segura e eficaz para o diagnóstico em humanos e animais com pitiose (VANITTANAKOM et al. 2004) e possibilita a detecção de infecções agudas ou crônicas (MENDOZA et al. 1997). Esta técnica detecta anticorpos específicos de maneira rápida e fácil, apresentando-se altamente sensível e específica (KRAJAEJUN et al. 2002; SANTURIO et al. 2006b). No Brasil, autores padronizaram o ensaio de ELISA para o diagnóstico da pitiose em equinos e coelhos, com a finalidade de diminuir a taxa de erros e o tempo de diagnóstico. Os resultados encontrados em equinos evidenciaram sensibilidade de 97,72% e especificidade de 90,27% e em coelhos sensibilidade de 91,66% e especificidade de 95,83% (SANTURIO et al. 2006b).

A técnica de *Western blot* tem sido aprimorada nos últimos anos por diversos autores, a fim de realizar uma análise apurada da resposta imunológica de *P. insidiosum*. Mendoza et al. (1992), realizou um estudo com a finalidade de investigar os possíveis抗ígenos que poderiam participar da resposta imune deste agente. Foram utilizados cinco isolados de *P. insidiosum* e a metodologia de *Western blot* detectou proteínas com massas moleculares que variaram de 68 a 14 KDa. No entanto, constatou que apenas três抗ígenos com massas moleculares de 32, 30 e 28 KDa, se destacaram dos demais e seriam as possíveis proteínas imunodominantes. Entretanto, demonstrou que todos os isolados utilizados apresentaram o mesmo perfil抗ígenico, independentemente da fonte e da localização. De acordo com esses autores, este fato revela a possível importância desses抗ígenos na imunidade da doença.

Mendoza, Ajello e McGinnis (1996), Vanittanakon et al. (2004), Pérez et al. (2005), Leal et al. (2005), Krajaejun et al. (2006) e Chindamporn et al. (2009), utilizaram *Western blot* para verificar a expressão e o reconhecimento de diferentes抗ígenos imunodominantes em isolados de *P. insidiosum* empregando soros de equinos, bovinos, caninos, coelhos e humanos com pitiose. Estes estudos demonstraram a presença de diferentes proteínas imunogênicas e sugerem a existência de variabilidade抗ígenica deste agente.

Leal et al. (2005) realizou sua pesquisa com um isolado brasileiro, utilizando soro de equinos e bovinos naturalmente infectados com pitiose, e coelhos infectados experimentalmente. Observaram que os anticorpos presentes no soro de equinos reconheceram抗ígenos de massas moleculares de 80, 39 e 33,5 KDa, destacando

que os coelhos apresentaram resultados similares. Entretanto, os bovinos reconheceram as proteínas de 70, 39-40 e 35 KDa. Pérez et al. (2005), utilizaram em seu estudo 57 bovinos oriundos da Venezuela e verificaram抗ígenos de massas moleculares de 203-51 KDa, destacando-se também proteínas de baixo peso molecular de ~32-30 KDa. Krajaejun et al. (2006), identificaram uma proteína de 74 KDa em isolados de *P. insidiosum* oriundos de humanos na Tailândia, sendo considerada imunodominante. Posteriormente, Krajaejun et al. (2010) identificaram esse antígeno como sendo uma exo-1,3- β -glucanase. As glucanases são enzimas hidrolíticas que estão presentes em muitos organismos, incluindo os oomicetos, todavia, sabe-se pouco sobre seu papel biológico e patológico (KRAJAEJUN et al. 2010).

Adicionalmente, Chindamporn et al. (2009) realizaram um estudo com isolados de *P. insidiosum* procedentes dos Estados Unidos, Costa Rica, Nova Guiné, Tailândia e Austrália e identificaram proteínas de diferentes pesos moleculares que foram reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro de equinos, bovinos, caninos, felinos e humanos. Estes autores sugeriram que as proteínas de 51-49, 34 e 28 KDa pareceram ser imunodominantes. Todavia, afirmam que os hospedeiros suscetíveis respondem a um amplo número de抗ígenos expressos pelo micro-organismo, com variações dentro da mesma espécie e entre as espécies.

Técnicas moleculares têm se apresentado como uma ótima ferramenta para detecção e identificação do agente da pitiose, principalmente na ausência da cultura (GROOTERS; GEE 2002). Estudos mais aprofundados em nível molecular podem levar a um melhor entendimento da enfermidade. Entre os métodos utilizados estão o sequenciamento do genoma, estudo de genética molecular, diagnóstico assistido por PCR, estudo genético populacional e análise filogenética (AZEVEDO et al. 2012; LOHNOO et al. 2014; RIBEIRO et al. 2016).

3.6 Tratamento

As infecções causadas por *P. insidiosum* merecem destaque, uma vez que geralmente respondem pobremente aos tratamentos (GAASTRA et al. 2010; SANTURIO et al. 2006a). Convém salientar, que o tamanho e a localização da lesão, assim como a idade e o estado nutricional do animal influenciam no sucesso

das diferentes formas de tratamento (MENDOZA et al. 1997). Existem três metodologias terapêuticas que são frequentemente utilizadas: quimioterapia, cirurgia e imunoterapia (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTURIO et al. 2006a).

Anteriormente nesta revisão, relatou-se que o agente da pitiose apresenta algumas diferenças dos fungos verdadeiros, entre elas, a ausência de ergosterol na membrana plasmática. O ergosterol é o componente alvo de ação da maioria dos antifúngicos (FOIL, 1996). Devido a esta característica, o tratamento da pitiose torna-se difícil, pois apresenta pouca suscetibilidade a maioria dos fármacos antifúngicos (FOIL, 1996; GAULIN et al. 2010; GROOTERS, 2003). Contudo, esses fatores estimularam várias tentativas de tratamento e testes de suscetibilidade *in vitro*, as quais foram realizadas utilizando fármacos antifúngicos como: anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol, compostos iodínicos, terbinafina e caspofungina, demonstrando resultados pouco promissores (MCMULLAN et al. 1977; GONZALES et al. 1979; DYKSTRA et al. 1999; GROOTERS, 2003; PEREIRA et al. 2007; ARGENTA et al. 2008; CAVALHEIRO et al. 2009a, 2009b).

Apesar da dificuldade de eliminação desse agente, estudos relatam que *P. insidiosum* apresenta suscetibilidade frente a compostos bioativos extraídos de plantas medicinais (FONSECA et al. 2015a, 2015b; VALENTE et al. 2016a, 2016b) e sua combinação com antimicrobianos (JESUS et al. 2015; VALENTE et al. 2016c). Geralmente o sucesso de algumas terapias está relacionado com suas associações entre dois compostos conforme relatado em diversas pesquisas (ARGENTA et al. 2008, 2012; CAVALHEIRO et al. 2009a, 2009b; LORETTTO et al. 2011; JESUS et al. 2015; ZANETTE et al. 2015; VALENTE et al. 2016a, 2016b, 2016c).

A cirurgia é o método mais popular e mais frequentemente utilizado no tratamento da pitiose em animais e no homem (GAASTRA et al. 2010). No entanto, a realização da intervenção cirúrgica necessita da retirada de toda área afetada, porém faz-se complicado pelas estruturas anatômicas envolvidas, predominantemente os membros. Em lesões pequenas e superficiais, o tratamento cirúrgico apresenta ótimos resultados (MILLER, 1981; SANTURIO et al. 2006a).

A imunoterapia surgiu como uma possibilidade para o tratamento da pitiose equina e tem sido utilizada por mais de 20 anos (GAASTRA et al. 2010). Miller (1981) desenvolveu o primeiro protocolo para essa terapia, utilizando um imunoterápico com hifas inativas de *P. insidiosum* para o tratamento de um equino

com pitiose. No decorrer dos anos, diversos autores realizaram modificações na técnica originalmente descrita e utilizaram a imunoterapia na pitiose equina, alcançando índices de cura que variaram de 50 a 83% (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA et al. 1992; MONTEIRO, 1999, SANTURIO et al. 2003). Embora a imunoterapia seja considerada uma prática segura, existem muitos casos que não apresentam resposta e em algumas espécies como cães e gatos os resultados são desapontadores (MENDOZA; NEWTON, 2005).

4 Artigo 1

Artigo publicado no periódico científico Medical Mycology.



Original Article

Protein profile of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates

Vanessa Dal Ben¹, Rômulo S. Oliveira², Jéssica L. Borchardt³, Júlia de Souza S. Valente¹, Carolina Lichtina Brasil¹, Cristina Gomes Zambrano¹, Fábio Pereira Leivas Leite³, Sônia de Avila Botton⁴ and Daniela Isabel Brayer Pereira^{1,*}

¹Laboratório de Micologia, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas/RS, Brazil, ²Laboratório da Modulação da Resposta Imune, Programa de Imunologia Básica e Aplicada, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, Brazil, ³Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas/RS, Brazil and

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Dr. Daniela Isabel Brayer Pereira, Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 18, Sala 14. Campus Universitário Capão do Leão, s/nº. CEP: 96160-000. Tel: +55 53 32757338; Fax: +55 53 32757338; E-mail: danielabrayer@gmail.com

Received 10 April 2017; Revised 27 June 2017; Accepted 13 September 2017; Editorial Decision 5 July 2017

Abstract

Pythium insidiosum is an important aquatic Oomycota that causes pythiosis in mammals, especially horses, dogs, and humans; these inhabit marshy environments in tropical and subtropical areas. The aim of this study was to determine the protein profile, as well as identify likely immunodominant proteins, of Brazilian *P. insidiosum* isolates from southern Brazil, an important equine pythiosis endemic area. *P. insidiosum* isolates (horses, $n = 20$ and dogs, $n = 02$) were analyzed by SDS-PAGE and Western blot techniques. Horse, cattle, dog, and rabbit sera of both diseased and healthy animals were used to identify *P. insidiosum* proteins. SDS-PAGE protein profile detected antigens of molecular weights ranging from 100 to 20 KDa. Dog isolates revealed a protein profile similar to that of horse isolates. Anti-*P. insidiosum* antibodies in the sera of the four species could recognize proteins of different molecular weights (~ 74 KDa to ~ 24 KDa), and proteins ~ 50 – 55 KDa and ~ 34 KDa were shown to be immunodominant. Furthermore, ~ 74 KDa, ~ 60 KDa, ~ 30 KDa and ~ 24 KDa proteins were poorly recognized by host species antibodies. The Brazilian *P. insidiosum* isolates analyzed showed a similar protein profile; however, further studies are essential for the identification and characterization of proteins expressed by *P. insidiosum*, and an evaluation of the immunological profile of hosts susceptible to this Oomycota is necessary.

Key words: *Pythium insidiosum*, pythiosis, Western blot, proteins, Oomycota.

Introduction

Pythium insidiosum is an important aquatic Oomycota that causes pythiosis in mammals, especially horses, dogs, and humans; however, other domestic and wild species may also be susceptible to infection. This microorganism shows some different morphological and biochemical characteristics from true fungi, and this may partially account for difficulties and failures in the therapies employed for disease treatment.¹

Pythiosis is a serious, progressive, and life-threatening disease for susceptible hosts inhabiting marshy environments in tropical and subtropical areas, especially in the Americas, Asia, and Australia.¹ Its diagnosis is based on clinical aspects of the disease, culture and microbiological identification, histopathological aspects, as well as by the use of molecular and serological methods.^{1–3}

Different serological techniques have been developed for the detection of antibodies against *P. insidiosum*, including immunodiffusion,^{4,5} complement fixation,⁴ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA),^{6–8} Western blot,^{9–12} immunochromatography,¹³ and haemagglutination.^{8,14}

Previous studies have shown that the protein and immunogenic profile of *P. insidiosum* include different immunodominant proteins of varying molecular weights that have been detected in the serum of several species of animals and humans infected by *P. insidiosum* in different countries.^{9–12} These studies demonstrated that the *P. insidiosum* profile is similar and independent of geographical location. However, susceptible hosts respond to a wide number of antigens expressed by the microorganism, with variations within the same species and between species.¹²

Equine pythiosis is endemic in Brazil, especially in the southern and Pantanal Matogrossense areas^{15–17} being a problem for equine production. In addition, reports on dogs,¹⁸ cattle,^{17,19} sheep,²⁰ goats,²¹ and humans²² reveal the presence of *P. insidiosum* in swampy environments in the country. Nevertheless, in spite of the increasing number of pythiosis cases that have been reported in Brazil in recent decades, studies reporting the antigenic characteristics of Brazilian *P. insidiosum* isolates are incipient. Only Leal et al.¹⁰ characterized the polypeptide profile of a *P. insidiosum* isolate by using horse, cattle, and rabbit serum.

This study aimed to determine the protein profile, as well as identify likely immunodominant proteins, of Brazilian *P. insidiosum* isolates.

Methods

Pythium insidiosum isolates and sera from infected animals

Twenty-two *P. insidiosum* isolates of naturally infected animals (horses $n = 20$, dogs $n = 02$) from the State of Rio Grande do Sul, Brazil, were analyzed (Table 1). All isolates were identified by their macro and micro morphological characteristics and confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing, as described by Azevedo et al.³ Four serum samples collected from *P. insidiosum* naturally infected animals (horse, $n = 1$, dog, $n = 1$; and cattle, $n = 1$) as well as serum from a rabbit with experimental pythiosis, were used. Horse, cattle, dog and rabbit sera of animals not infected by *P. insidiosum* were used as negative control. The sera were kept at -20°C until use.

Antigen preparation

In this study, the antigen preparation protocol followed recommendations previously described by Chindamporn et al.¹², adapted. Briefly, *P. insidiosum* isolates were grown on 0.1% yeast agar and incubated at 37°C for 72 hours. Small culture fragments were transferred to 150 ml Sabouraud broth and incubated at 37°C under constant stirring (120 rpm). After 5 days, the cultures were inactivated with thimerosal (0.02%/vol), filtered, and macerated in three liquid nitrogen baths. The resulting macerated powder was diluted in 10 ml distilled water and the resulting supernatant was named macerated mycelial antigen (MMA). All antigen preparations were used on the same day.

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

In sum, 40 μl SDS buffer (4% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol, 120 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% 2- β mercaptoethanol, and 0.3% Bromophenol blue) was added to a 50 μl volume ($\sim 2 \mu\text{g protein}/\mu\text{l}$) of the mycelial macerated antigen preparation. Samples were denatured at 100°C for 10 minutes, centrifuged (10,000g/20 seconds) and subjected to electrophoresis in 12% polyacrylamide gel. The gels were stained with Coomassie brilliant blue (Bio-Rad Laboratories) for protein band visualization and compared to the molecular weight marker (Bio-Rad Laboratories).

Western blot

Proteins separated from SDS-PAGE gels were transferred by electrophoresis to nitrocellulose (0.45 μm) Polyvinylidene

Table 1. *Pythium insidiosum* isolates used in this study ($n = 22$) and their corresponding information including: host (species, years old, and sex), geographical origin, location of lesion, treatment, and outcome of pythiosis.

<i>P. insidiosum</i> isolates*	Host	Age (years)	Sex	Origin of isolates/geographical coordinates**	Location of lesions	Treatment	Outcome
01	Horse	20	M	São Lourenço do Sul (latitude -31° 21' 55"; longitude -51° 58' 42")	Left hind limb	Immunotherapy	Death
02	Horse	1	F	Uruguaiana (latitude -29° 45' 17"; longitude -57° 05' 18")	Right hind limb	Immunotherapy	Death
03	Horse	10	F	Santa Vitória do Palmar (latitude -33° 31' 08"; longitude -53° 22' 05")	Right hind limb	Immunotherapy	NI
04	Horse	5	F	Santa Vitória do Palmar	Left hind limb	Immunotherapy	Euthanasia
06	Horse	10	F	Santa Vitória do Palmar	Right hind limb	Immunotherapy	NI
08	Horse	2	M	Uruguaiana	Left hind limb	Immunotherapy	Death
09	Horse	18	M	Santa Vitória do Palmar	Left hind limb	Immunotherapy	Cure
12	Horse	8	M	Capão do Leão (latitude -31° 45' 48"; longitude -52° 29' 02")	Right hind limb	Immunotherapy	NI
13	Horse	10	F	Abdomen	Immunotherapy	Euthanasia	NI
14	Horse	15	F	Left hind limb	Immunotherapy	NI	Euthanasia
15	Horse	8	F	Right hind limb	Immunotherapy	NI	NI
16	Horse	1	M	Right hind limb/left hind limb/left upper limb	Immunotherapy	NI	NI
17	Horse	5	M	Capão do Leão	Right hind limb	Immunotherapy	NI
18	Horse	7	F	Pelotas (latitude -31° 46' 19"; longitude -52° 20' 33")	Abdomen	Immunotherapy	NI
19	Horse	12	F	Pelotas	Labial commissure; left upper limb	Immunotherapy	Euthanasia
20	Horse	6	M	Rio Grande (latitude -32° 02' 06"; longitude -52° 05' 55")	Lip	Anti-inflammatory and antibiotic therapy/immunotherapy	NI
21	Horse	16	M	Rio Grande	Right upper limb	Immunotherapy	Euthanasia
26	Horse	4	M	Pelotas	Left hind limb	NI	NI
28	Horse	10	F	Pelotas	Left upper limb	NT	NI
32	Horse	16	F	Cristal (latitude -30° 59' 59"; longitude -52° 02' 54")	Right upper limb	Immunotherapy	NI
22	Canine	2,5	M	Canguçu (latitude: -31° 23' 42"; longitude: -52° 40' 32")	Stomach/Duodenum	Immunotherapy/antifungal therapy	Cure
23	Canine	3	M	Pelotas	Stomach	NT	Euthanasia

Identification of each *P. insidiosum* isolate analyzed in this research. **Corresponding geographical coordinates to counties located in Rio Grande do Sul State, South of Brazil. M, Male. F, Female. NI, No information provided. NT, No submitted to any therapy.

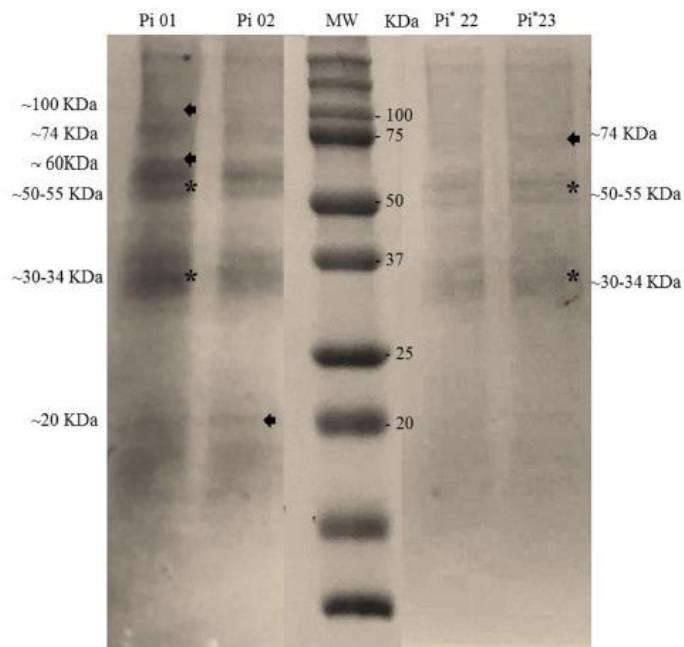


Figure 1. SDS-PAGE profiles of proteins from *Pythium insidiosum*. MW: molecular weight marker: 100, 75, 50, 37, 25 and 20 KDa. Pi: *Pythium insidiosum* isolates from horse. Pi* (Pi 22 and Pi 23): *Pythium insidiosum* isolates from dog. Asterisks, overexpressed proteins (~50-55 KDa and ~30-34 KDa) and putative immunodominant antigens found on almost all WB membranes; arrows, weakly expressed proteins (~100, ~74 and ~20 KDa). The gels were stained with Coomassie brilliant blue.

fluoride (Amersham™ Hybond™ - ECL GE Healthcare) membranes at constant voltage (40 volts) for 3 hours and 30 minutes. In the blocking step, the membranes were submerged for 1 hour in PBS-T (phosphate buffered saline, PBS containing 0.1% Tween 20, pH 7.4) plus 5% skimmed milk powder. Afterward, three washes in PBS-T were performed. The analyzed sera were incubated at 37°C for 1 hour under stirring (50 rpm) in PBS-T and diluted, respectively: horse, cattle, and rabbit serum (1: 1000) and dog serum (1: 500). Then, three washes were performed in PBS-T. The binding of the antibodies present in animal serum to the antigens transferred to the membrane was detected by immunoglobulin G conjugated with anti-species peroxidase (Sigma-aldrich) (horse, dog, cattle, and rabbit) in the following dilutions: anti-horse and anti-rabbit (1: 6000), anti-dog (1: 3000), and anti-bovine (1: 5000). Again, three washes were performed in PBS-T. Reactions were revealed with diaminobenzidine (DAB Sigma-aldrich) (Tris HCl pH 7.6, nickel sulfate, DAB, H₂O₂). Molecular weights of the detected proteins were estimated by comparison to a standard molecular weight marker (Precision Plus Protein™ Prestrained Standards Dual Color, Bio-RadLaboratories).

Results

The SDS-PAGE protein profile of the 22 *P. insidiosum* isolates detected antigens of molecular weights ranging from approximately 100 to 20 KDa. It was observed that all isolates overexpressed a band at ~50–55 and ~30–34 kDa and weakly expressed proteins with molecular masses of ~100, ~74, and ~20 kDa (Fig. 1).

Table 2 shows the protein profile of the 22 *P. insidiosum* isolates evaluated in the present study, which were recognized by the specific antibodies in horse, cattle, rabbit, and dog serum. It was evidenced that anti-*P. insidiosum* antibodies in the sera of the four species recognized proteins of different molecular weights (~74 KDa to ~24 KDa) of the *P. insidiosum* isolates analyzed. In the control sera of species not infected by *P. insidiosum*, there was not recognition of any proteins. Antibodies present in the sera of the four species evaluated were able to recognize predominantly ~60 KDa, ~50–55 KDa, ~34 KDa, and ~24 KDa proteins (Fig. 2). The ~34 KDa protein from horse and dog of *P. insidiosum* isolates was strongly immunolabeled by the sera from all hosts evaluated.

Table 2. Protein profile of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates ($n = 222$) from equines and canines naturally infected.

	Pi	HS	01*	02*	03*	04*	05*	06*	08*	09*	10*	13*	14*	15*	16*	17*	18*	19*	20*	21*	26*	28*	32*	23**
Horse	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	
	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
	<u>50-55</u>																							
	<u>34</u>																							
Bovine	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	
	-	74	-	74	74	-	74	-	74	-	74	-	74	-	74	-	74	-	74	-	74	-	74	
	60	60	-	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
	<u>50-55</u>																							
Rabbit	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	
	-	74	74	-	74	-	74	-	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	
	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
	<u>50-55</u>																							
Canine	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	
	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
	<u>50-55</u>																							
	<u>34</u>																							
	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	
	-	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	
	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
	<u>50-55</u>																							
	<u>34</u>																							
	-	30	30	-	30	30	-	30	30	-	30	30	-	30	30	-	30	30	-	30	30	-	30	
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	
	-	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	

Pi, *Pythium insidiosum* isolate; HS, Host serum. The underlined proteins were strongly immunomarked. (-) Not observed. *Isolates from horse. **Isolates from canine.

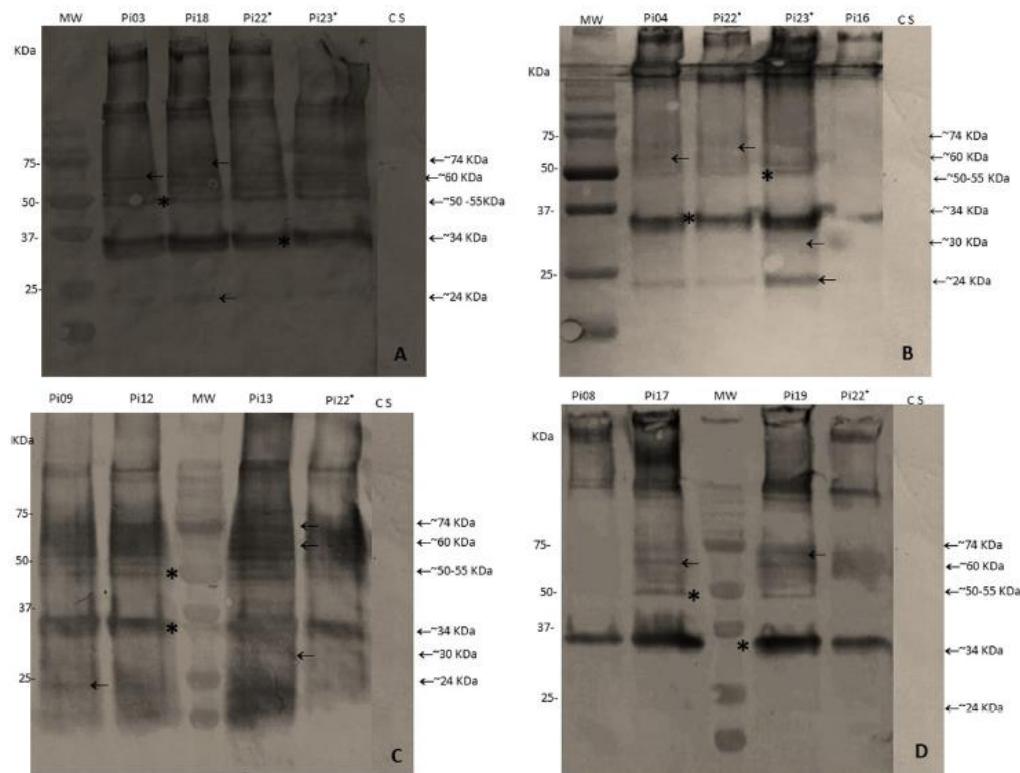


Figure 2. Western blot analysis of serum sample from horse (A), cattle (B), dog (C) and rabbit (D) with pythiosis. MW: molecular weight marker; 75, 50, 37 and 25 KDa. Pi: *Pythium insidiosum* isolates from horse. Pi* (Pi 22 and Pi 23): *Pythium insidiosum* isolates from dog. CS: control serum; Asterisks, the ~50-55 KDa and ~34 KDa immunodominant antigens; arrows, the ~74 KDa, ~60 KDa, ~30 KDa and ~24 KDa antigens.

Proteins of approximately 74 KDa and 30 KDa were found to be poorly recognized by the antibodies of the host species evaluated. *P. insidiosum* isolates of horses ($n = 20$) and dogs ($n = 2$) came from an area considered endemic for equine pythiosis in Brazil. Interestingly, the isolates from dogs showed a protein profile similar to that of horses (Table 2).

Discussion

The profile of Brazilian *P. insidiosum* isolates evaluated by SDS-PAGE identified proteins of different molecular weights, ranging from approximately 100 to 20 KDa. Previous studies by other authors revealed protein profiles similar to those found in this study. Mendoza et al.⁹, upon evaluating *P. insidiosum* isolates from Costa Rica, the United States, Japan, and Australia, found antigens from 97 to 14 KDa. Krajaejun et al.¹¹ found that human *P. insidio-*

sum isolates from Thailand had a protein profile from 120 to 15 KDa. However, Chindamporn et al.¹², upon evaluating animal isolates from the United States, Costa Rica, New Guinea, and Australia, as well as human isolates from Thailand, identified proteins ranging from 209 to 9 KDa. In Brazil, Leal et al.¹⁰, when determining the protein profile of a clinical horse isolate of *P. insidiosum*, detected proteins of molecular weights (104 to 20 KDa) similar to those verified in the present study.

The Brazilian *P. insidiosum* isolates ($n = 22$) evaluated in this study showed a similar protein profile, and there were no significant differences between horse and dog *P. insidiosum* isolates. In Brazil, the State of Rio Grande do Sul^{13,16} and the Pantanal Matogrossense¹⁷ are areas thought to be endemic for equine pythiosis. Azevedo et al.³ and, more recently, Ribeiro et al.²³ demonstrated that Brazilian *P. insidiosum* isolates share phylogenetic and phylogeographic similarities, regardless of their origin. Similarly, the results

obtained in this study showed that the Rio Grande do Sul isolates share the same antigenic profile, suggesting that they may be representative of Brazilian isolates. However, other studies including isolates from other regions of Brazil are necessary so that this hypothesis can be confirmed. Mendoza et al.⁹ and Chindamporn et al.¹² demonstrated that horse and human *P. insidiosum* isolates from different geographic locations have similar antigenic profiles.

In the present study, it could be observed that anti-*P. insidiosum* antibodies from horse, cattle, rabbit, and dog sera were able to recognize proteins of different molecular weights ranging from approximately 74 KDa to 24 KDa. It is noteworthy that ~50–55 KDa and ~34 KDa proteins were predominantly detected in all isolates and recognized by the sera of the hosts included in the study, and thus can be considered immunodominant proteins of Brazilian *P. insidiosum* isolates. Although these proteins did not have exactly the same molecular weight as described by other studies in literature,^{9,10,12} they are believed to be similar, since their molecular weights were close to one another. According to Chindamporn et al.¹², these differences may be due to the lack of standardization between the methodologies used by the different studies. Despite the fact that present study chose to use the method previously proposed,¹² adaptations to Western blot technique were necessary.

Approximately 34 KDa protein from *P. insidiosum* horse and dog isolates was strongly labeled by anti-*P. insidiosum* antibodies in the evaluated hosts. Even though proteins of identical molecular weights had not been previously described, evidence suggests that proteins with molecular weights of 33.5 KDa, as described by Leal et al.¹⁰ in Brazilian horse isolates, and the 34 kDa protein reported by Chindamporn et al.¹², may have the same profile as that found in this study. Additionally, Brazilian isolates expressed a protein of approximately 50–55 KDa recognized by the specific antibodies in the sera of the animals tested. This is believed to be the same protein of approximately 51 KDa reported by Chindamporn et al.¹², recognized only by dog, cat, cattle, and horse sera infected by *P. insidiosum*. The ~60 KDa band was identified in most *P. insidiosum* isolates and was recognized by the antibodies present in the host serum. This protein had only been reported only by Chindamporn et al.¹² in a human *P. insidiosum* isolate and is recognized by dog antibodies. It was observed that the Brazilian isolates evaluated showed a low molecular weight band (~24 KDa), unreported by previous studies.^{9,10,12} However, an immunodominant 28 KDa protein was reported by Mendoza et al.⁹ in *P. insidiosum* isolates from different geographic areas and later by Chindamporn et al.¹² in *P. insidiosum* isolates from the Americas.

In this study, antigens weakly recognized by anti-*P. insidiosum* antibodies included proteins of ~74 KDa and

~30 KDa. It is worth mentioning that proteins of approximately 30–32 KDa have been previously identified by Mendoza et al.⁹ in horses and Chindamporn et al.¹² in horses and cattle. Additionally, other authors detected a double band of approximately 30–32 KDa in bovine serum infected by this Oomycota in Venezuela.²⁴

Brazilian isolates presented a band corresponding to a ~74 KDa protein that was poorly recognized by the serum of the animal species included in the study. In addition, this ~74 KDa protein has also been evidenced in horses and dogs.¹² This protein was first highlighted by Krajaeun et al.¹¹ in *P. insidiosum* sera of infected humans in Thailand, and has been characterized as an exo-1,3-β-glucanase,²⁵ possibly being involved in remodeling the cell wall of the microorganism and is a possible target for the development of diagnostic tests and as an immunotherapeutic.

The Brazilian *P. insidiosum* isolates studied have a similar protein profile, showing immunodominant proteins recognized by the specific antibodies occurring in the serum of naturally and experimentally infected hosts. However, additional studies are essential for the identification and characterization of the proteins expressed by *P. insidiosum*, as well as for the evaluation of a wider number of serum samples from infected animals so as to verify the serological profile of hosts susceptible to this microorganism.

The information obtained in this research is relevant and will serve as a basis for the understanding of parasite-host relationships, as well as aspects related to pythiosis diagnosis and control.

Acknowledgments

This work was supported through resources provided by Postgraduate Program in Parasitology/UFPel and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) of Brazil (Researcher scholarships). The authors would like to thank the CNPq and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) of Brazil for student and researcher scholarships.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

1. Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol*. 2010; 146: 1–16.
2. Grooters AM, Gee MK. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *J Vet Intern Med*. 2002; 16: 147–152.
3. Azevedo MI, Botton SA, Pereira DIB et al. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. *Vet Microbiol*. 2012; 159: 141–148.

4. Miller RI, Campbell SF. Clinical observations on equine phycomycosis. *Aust. Vet. J.* 1982; 58: 221–226.
5. Mendoza L, Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. *Mycopathologia*. 1986; 94: 123–129.
6. Mendoza L, Kaufman L, Mandy W, Glass R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997; 4: 715–718.
7. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Alves SH. Indirect ELISA for the serodiagnostic of pythiosis. *Pesq Vet Bras.* 2006; 26: 47–50 [Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose].
8. Charoenisutthigul T, Khosinithikul R, Intaramat A et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 76: 42–45.
9. Mendoza L, Nicholson V, Prescott JF. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2980–2983.
10. Leal AT, Santurio JM, Leal ABM et al. Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum* antigens. *J Mycol Med.* 2005; 15: 63–68.
11. Krajaejun T, Kunakorn M, Pracharttam R et al. Identification of a novel 74-Kilodalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1674–1680.
12. Chindamporn A, Vilela R, Hoag KA, Mendoza L. Antibodies in the sera of host species with pythiosis recognize a variety of unique immunogens in geographically divergent *Pythium insidiosum* strains. *Clin Vac Immunol.* 2009; 16: 330–336.
13. Krajaejun T, Imkheo S, Intaramat A, Ratanabanangkoon K. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. *Clin Vac Immunol.* 2009; 16: 506–509.
14. Jindayok T, Piromsonkorn S, Srimuang S, Khupulsup K, Krajaejun T. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. *Clin Vac Immunol.* 2009; 16: 1047–1051.
15. Marcolongo-Pereira C, Sallis ESV, Raffi MB et al. Epidemiology of equine pythiosis in southern of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2012; 32: 865–868 [Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul].
16. Weiblen C, Machado G, Jesus FPK et al. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. *Cienc Rural.* 2016; 46: 126–131.
17. Santos CE, Santurio JM, Marques LC. Pythiosis of livestock in the Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2011; 31: 1083–1089 [Pitiose em animais de produção no Pantanal Matogrossense].
18. Pereira DIB, Bottos SA, Azevedo MI et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. *Mycopathologia.* 2013; 176: 1–7.
19. Grecco FB, Schild AL, Quevedo P et al. Cutaneous pythiosis in cattle in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2009; 29: 938–942 [Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul].
20. Tabosa IM, Riet-Correa F, Nobre VM, Azevedo EO, Reis-Júnior JL, Medeiros RM. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in north-eastern Brasil. *Vet Pathol.* 2004; 41: 412–415.
21. Do Carmo PMS, Portela RA, Silva TR, Oliveira-Filho JC, Riet-Correa F. Cutaneous pythiosis in a goat. *J Comp Pathol.* 2014; 152: 103–105.
22. Bosco SMG, Bagagli E, Araújo JP Jr et al. Human pythiosis, Brasil. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 715–718.
23. Ribeiro TC, Weiblen C, De Azevedo MI et al. Microevolutionary analyses of *Pythium insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based on exo-1,3-β-glucanase gene. *Infect Genet Evol.* 2017; 48: 58–63.
24. Pérez RC, Luis-León JJ, Vivas JL, Mendoza L. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. *Vet Microbiol.* 2005; 109: 121–128.
25. Krajaejun T, Keeratijarut A, Sriwanichrak K et al. 74-kiloDalton immunodominant antigen of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* is a putative Exo-1,3-β glucanase. *Clin Vac Immunol.* 2010; 17: 1203–1210.

5 Manuscrito 1

Pesquisa de anticorpos anti-*Pythium insidiosum* em equinos sadios

Vanessa Dal Ben¹, Jéssica L. Borchardt¹, Júlia de Souza S. Valente¹, Cristina Gomes Zambrano¹, Guilherme Weege¹, Fábio Pereira Leivas Leite¹, Sônia de Avila Botton³, Daniela Isabel Brayer Pereira^{1*}

¹Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia,
Universidade Federal de Pelotas/RS, Brasil

²Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS,
Brasil

Resumo

O objetivo do presente estudo foi verificar a presença de anticorpos anti-*P. insidiosum* em equinos clinicamente sadios para pitiose. As amostras de soro analisadas foram provenientes do sul do Rio Grande do Sul, região endêmica para pitiose. Foram analisados pelo método de ELISA indireto 906 soros de equinos clinicamente sem pitiose. Em 6,18% dos soros (56/906) foram detectados títulos de anticorpos anti-*P. insidiosum* iguais ou superiores ao cut-off (OD=0,349). Posteriormente foram selecionados os soros (06/56) que apresentaram título de anticorpos acima do cut-off para a realização da técnica de *Western blot*. Evidenciou-se que os anticorpos presentes nos soros dos animais reconheceram os抗ígenos imunodominantes de *P. insidiosum* de massas moleculares de aproximadamente ~50-55 KDa e ~34 KDa, as quais apresentaram-se fortemente imunomarcadas. Adicionalmente, verificou-se que a massa molecular de ~74 KDa foi fracamente reconhecida pelos anticorpos. Os resultados deste estudo sugerem que a resposta imune humoral detectada nos equinos sadios foi resultante da exposição ambiental a *P. insidiosum*. Pesquisas avaliando uma maior população de animais sadios são imprescindíveis para entender a resposta imunológica na exposição ao patógeno, bem como determinar a participação da resposta na proteção do hospedeiro às infecções por *P. insidiosum*.

Palavras-Chave: *P. insidiosum*, pitiose, ELISA, *Western blot*.

Introdução

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum* é o agente causador da pitiose, uma doença granulomatosa crônica (ALEXOPOULOS et al. 1996, 2010). A enfermidade é prevalente em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (GAASTRA et al. 2010). Apresenta distribuição mundial, entretanto, no Brasil é considerada endêmica em regiões como o Pantanal Mato-grossense e Rio Grande do Sul (RS) (SANTOS et al. 2011; MARCOLONGO-PEREIRA et al. 2012; WEIBLEN et al. 2016).

A pitiose afeta uma variedade de animais domésticos e silvestres, todavia é mais comumente observada em equinos (SANTURIO et al. 2006a). A presença dos *kunkers*, massa necrótica semelhante a corais, é a principal característica da enfermidade nesta espécie (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; CHAFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995). O tratamento da pitiose é considerado difícil pelas peculiaridades do micro-organismo e limitações do diagnóstico. A ausência de ergosterol em sua membrana citoplasmática, explica a pouca suscetibilidade de *P. insidiosum* aos fármacos antifúngicos (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003; GAULIN et al. 2010).

Contudo, os prejuízos causados por *P. insidiosum* nas criações de equinos são significativos, seja pela morte dos animais, pela perda de função ou pelo custo do tratamento (LEAL et al. 2001). Estudos prévios avaliando a prevalência e incidência da pitiose equina no RS mostraram que a enfermidade apresenta índices que variaram de 8,3% a 14,5% (SOUZA et al. 2011; MARCOLONGO-PEREIRA et al. 2014). Adicionalmente, Weiblen et al. (2016) relataram que em 11,1% de amostras de soro de equinos oriundos de diferentes mesorregiões do RS foram detectados níveis de anticorpos anti-*P. insidiosum*. Estas pesquisas apontam a relevância da enfermidade em equinos no RS, provavelmente devido às características geográficas da região como campos planos e sujeitos a alagamentos, facilitando a propagação do agente (MARCOLONGO-PEREIRA et al. 2012).

Em condições de campo, observa-se que num mesmo ambiente contaminado com *P. insidiosum* nem todos os animais expostos são infectados, podendo haver uma suscetibilidade individual ao desenvolvimento da enfermidade. Todavia, os fatores que predispõem os animais suscetíveis a adquirir a enfermidade ainda não são completamente conhecidos. Alguns autores sugerem que defeitos em genes

relacionados aos receptores de células-chave, bem como a possível falha no reconhecimento inicial do patógeno poderia tornar os hospedeiros suscetíveis a *P. insidiosum* (MENDOZA; NEWTON, 2005; MENDOZA; VILELLA, 2013).

Estudos avaliando a resposta imunológica de animais com pitiose e/ou submetidos a imunoterapia revelam a presença de altos títulos de anticorpos anti-*P. insidiosum* que podem ser detectados por diferentes técnicas sorológicas, incluindo o ensaio de ELISA e *Western Blot* (MENDOZA et al. 1992, 1997; GROOTERS et al. 2002; LEAL et al. 2005; KRAJAEJUN et al. 2006; SANTURIO et al. 2006; CHINDAMPORN et al. 2009; SANTOS et al. 2011, CHAREONSIRISUTHIGUL et al. 2013; DAL BEN et al. 2018). No entanto, pesquisas avaliando a resposta imune de animais sadios e expostos a ambientes com *P. insidiosum* não foram realizadas. Previamente, Miller e Campbell (1982) e Weiblen et al. (2016) sugeriram que o estímulo antigênico de *P. insidiosum* resultante da exposição aos ambientes contaminados pode induzir uma resposta imune, baseados na presença de equinos sadios soro-reagentes em ensaios imunológicos.

Acredita-se que o desenvolvimento de estudos avaliando animais sadios é importante para entender a resposta imunológica na exposição ao patógeno, bem como determinar a participação dessa resposta na proteção do hospedeiro às infecções por *P. insidiosum*.

O presente estudo teve como objetivo verificar a presença de anticorpos anti-*P. insidiosum* em equinos clinicamente sadios para pitiose.

Material e Métodos

Soros de equinos clinicamente sadios para pitiose

Foram analisados 906 soros de equinos clinicamente sem pitiose. As amostras foram oriundas de municípios do sul do Rio Grande do Sul, região endêmica para pitiose, e foram gentilmente cedidas pelo Goudapp Laboratório Veterinário de Análises Clínicas Ltda, credenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA/Brasil) para o diagnóstico de anemia infecciosa equina.

ELISA indireto

A metodologia empregada foi baseada na técnica descrita por Santurio et al. (2006a), com algumas modificações.

Foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano, sensibilizadas com 19 μ L antígeno (100 μ L/poço), diluído em 10mL de tampão carbonato 0,05M pH 9,6 e incubadas durante 1:30h/37°C para adsorção na superfície da placa. Após foi realizada a lavagem das placas com PBS-T (solução salina tamponada com fosfato, PBS contendo 0,1% de Tween 20; pH 7,4). A próxima etapa foi o bloqueio com leite em pó 5% (100 μ L/poço). Os soros foram diluídos (1:800) em PBS-T (100 μ L/poço) e incubados por 1h/37°C. Após foi realizada a lavagem (3x) com PBS-T. Posteriormente adicionou-se o anticorpo secundário espécie específico (anti-IgG conjugado com a peroxidase) (1:5000), incubado durante 1:30h/37°C. Após esse período, procedeu-se a lavagem (5x) com PBS-T. Por fim, a solução de revelação (100 μ L/poço), contudo substrato cromogênico (orthophenylene-diamine, OPD) diluído em tampão citrato-fosfato 0,15M pH 5,0 e H₂O₂ (0,004/10mL/10 μ l). As placas foram incubadas por 15 minutos no escuro e a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 3% (50 μ L/poço). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas, com comprimento de onda de 492nm.

Resultados do ELISA

Todas as amostras foram testadas em triplicata, sendo cada vez em duplicata. Os controles positivos e negativos foram utilizados em todos os testes realizados. O ponto de corte (cut-off) foi baseado no valor da média da densidade óptica (OD) adicionado três vezes o desvio padrão das amostras negativas, com nível de confiança de 99,8%. As amostras que apresentaram título superior ao ponto de corte (OD 0,349) foram consideradas positivas para pitiose equina, enquanto que as amostras com densidade óptica (OD) menor que o ponto de corte foram interpretadas como negativas.

Western blot (WB)

A preparação do antígeno, a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), bem como a metodologia empregada na realização do *Western blot* seguiram o protocolo previamente descrito por Dal Ben et al. (2018).

Resultados

O teste de ELISA indireto detectou 6,18% (56/906) de soros com OD (OD=0,349) igual ou superior ao ponto de corte para pitiose equina.

De acordo com os resultados obtidos no ELISA, os soros (06/56) que apresentaram anticorpos anti-*P. insidiosum* acima do ponto de corte (OD=0,391; 0,423; 0,466; 0,517; 0,559 e 0,583) foram submetidos à técnica de *Western blot*. Os seis soros avaliados reconheceram proteínas de *P. insidiosum* com massas moleculares de ~50-55 KDa e ~34 KDa, as quais apresentaram-se fortemente imunomarcadas. Adicionalmente, observou-se uma proteína de aproximadamente 74 KDa, porém de menor intensidade.

Quando pesquisado o histórico desses animais verificou-se que eram equinos sadios, sem relato da ocorrência de pitiose. Todavia, em uma das propriedades de origem dos animais foi informado que a doença havia ocorrido alguns anos atrás. Nas demais propriedades não obteve-se retorno dos proprietários e/ou veterinários ou não souberam informar.

Discussão

No Brasil, apesar de não existir um inquérito epidemiológico preciso sobre a incidência da pitiose equina, esta enfermidade é considerada um problema para a criação de equinos, principalmente em regiões alagadiças (SANTURIO et al. 2006b).

As amostras de soro empregadas nesta pesquisa foram coletadas para monitoramento de anemia infecciosa equina em animais provenientes de diferentes municípios da região sul do RS, considerada endêmica para pitiose em equinos. No presente estudo constatou-se que 6,18% (56/906) dos soros analisados apresentaram anticorpos anti-*P. insidiosum* com OD igual ou superior ao ponto de corte (0,349). Destes 56 soros, em seis que apresentaram OD superior ao cut-off verificou-se por WB que os anticorpos reconheceram proteínas imunodominantes de massas moleculares de ~50-55 KDa e ~34 KDa, previamente relatadas por Dal Ben et al. (2018). Em contato com os proprietários e/ou veterinários responsáveis por esses animais constatou-se que não havia histórico prévio da ocorrência da doença nesses equinos avaliados. Embora não tenha sido possível obterem-se informações

epidemiológicas em todas as propriedades-origem dos animais, em um dos estabelecimentos confirmou-se que a enfermidade havia ocorrido há alguns anos atrás. Este fato sugere que a presença de anticorpos nestes equinos possa ser decorrente do estímulo antigênico de *P. insidiosum* no ambiente, como previamente sugerido por Miller e Campbell (1982) e posteriormente por Weiblen et al. (2016). Adicionalmente, a presença de anticorpos que reconheceram especificamente as proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* indica que esses抗ígenos desencadeiam uma resposta imune humoral em contato com o hospedeiro (MILLER; CAMPBELL, 1982; MENDOZA et al. 1992; MENDOZA; NEWTON, 2005) sugerindo que a resposta imune foi específica e eliminando a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas com outras espécies de oomicetos encontradas no ambiente. Contudo, outros estudos avaliando uma maior população de animais sem a doença clínica e expostos a ambientes contaminados são requeridos.

Previvamente, Weiblen et al. (2016) ao avaliarem a soroprevalência da pitiose equina pelo método de ELISA em diferentes mesorregiões do RS encontraram índices de 11,1% para a enfermidade em equinos, indicando a presença de *P. insidiosum* nas diferentes regiões do RS. No entanto, estes autores não apontaram em seu estudo informações epidemiológicas relativas à pitiose, como a presença de lesões cutâneas, emprego de terapias, índices de cura e histórico da enfermidade nas propriedades estudadas.

Santos et al. (2011), relataram que altos títulos (72% e 130% acima do cut-off) de anticorpos anti- *P. insidiosum* são frequentemente observados em animais com pitiose ou que foram submetidos a imunoterapia. No entanto, em seu estudo, esses autores não avaliaram o perfil imunológico de animais saudáveis e que habitam ambientes contaminados com o oomiceto.

P. insidiosum é um micro-organismo aquático que realiza parte de seu ciclo biológico em águas de rios, lagoas e lagos. Dentro deste habitat são comumente encontrados nas águas rasas próximas às margens, onde realizam sua reprodução assexuada dando origem a zoósporos infectantes (ALEXOPOULOS et al. 1996). Desta forma, os mamíferos suscetíveis, principalmente equinos, caninos e homem, se infectam ao entrar em contato com os ambientes contaminados (MENDOZA et al. 1996, GAASTRA et al. 2010). A presença de *P. insidiosum* em nichos ecológicos aquáticos foi constatada em estudos realizados na Austrália (MILLER, 1983),

Tailândia (SUPABANDHU et al. 2008), Estados Unidos (PRESSER; GOSS, 2015) e Brasil (ZAMBRANO et al. 2017). Mendoza e Vilella (2013), baseados na ocorrência de poucos casos de pitiose em mamíferos em áreas endêmicas, sugeriram que o reconhecimento e a resposta inicial do hospedeiro a presença de hifas pode controlar o patógeno e eficientemente eliminar *P. insidiosum*. Adicionalmente, Mendoza et al. (2003), inferiram que a proteção a reinfecção pode ser devida a produção de anticorpos, principalmente IgG. Por outro lado, segundo Mendoza e Newton (2005) é possível que humanos e animais suscetíveis possam abrigar defeitos em genes relacionados aos receptores de células-chave que os tornam suscetíveis a esse oomiceto patogênico. Contudo, os exatos mecanismos pelos quais alguns animais resistem e/ou são suscetíveis à infecção por *P. insidiosum* ainda não estão completamente elucidados e urgentemente necessitam ser estudados.

O diagnóstico através da técnica imunoenzimática indireta (ELISA) possibilita a detecção de infecções precoces e subclínicas (MENDOZA et al. 1997), sendo empregada para o diagnóstico da pitiose em animais e humanos (MENDOZA et al. 1997; GROOTERS et al. 2002; VANITTANAKOM et al. 2004; PEREZ et al. 2005; SANTURIO et al. 2006b). Chareonsirisuthigul et al. (2013), realizaram um estudo comparativo entre diferentes técnicas, tais como ELISA, imunodifusão, imunocromatografia e hemaglutinação, no entanto a técnica de ELISA foi considerada a primeira escolha. No Brasil, autores padronizaram o ensaio de ELISA para o diagnóstico da pitiose em equinos evidenciando sensibilidade de 97,72% e especificidade de 90,27% (SANTURIO et al. 2006b). Embora pelo método de ELISA não seja possível diferenciar a origem do estímulo antigênico (WEIBLEN et al. 2016), acredita-se que os animais que foram soropositivos no presente estudo eram equinos sadios e que, possivelmente, os níveis de anticorpos detectados resultaram de uma exposição ambiental ao patógeno.

Conclusão

No presente estudo verificou-se que 6,18% dos equinos provenientes de área endêmica de pitiose no RS, sem sinais clínicos de pitiose, apresentaram anticorpos

anti-*P.insidiosum*. Sugere-se que a resposta imune humoral detectada nesses animais pode ser resultante de uma exposição ambiental a *P. insidiosum*.

Referências

- ALEXOPOULOS, C. J. et al. Phylum Oomycota. In: _____. **Introductory Mycology**. 4^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p.683-737.
- CHAFFIN, M. K. et al. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America:Equine Practice**, v. 11, p. 91-103, 1995.
- CHAREONSIRISUTHIGUL, T. et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 76, p. 42-45, 2013.
- DAL BEN, V. et al. Protein profile of Brazilian Pythium insidiosum isolates. **Medical Mycology**, v. 56, n. 4, p. 485-492, 2018.
- FOIL, C. S. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**, v. 23, p. 57-63, 1996.
- GAASTRA, W. et al. Pythium insidiosum: an overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, n. 1, p. 1-16, jul. 2010.
- GAULIN, E.; BOTTIN, A.; DUMAS, B. Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. **Plant Signaling Behav**, v. 5, p. 258–60, 2010.
- GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of Pythium insidiosum. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 2, p. 147-152, 2002.
- GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, p. 695-720, 2003.
- KRAJAEJUN, T. et al. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 378-382, 2002.

LEAL, A. B. et al. Pitíos e eqüina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 151-56, 2001.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 865-868, set. 2012.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 205-210, 2014.

MENDOZA, L. et al. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2980-2983, 1992.

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2967-73, 1993.

MENDOZA, L. et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médical**, v. 6, n. 4, p. 151-164, abr.1996.

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 715-718, 1997.

MENDOZA, L. et al. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, v. 21, p. 2797-2804, 2003.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, p. 477-486, 2005.

MENDOZA, L.; VILELLA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 198-208, 2013.

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 221-226, 1982.

MILLER, R. I. Investigations into the biology os three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopatologia**, v. 81, p. 23-28, 1983.

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

PRESSER, J. W.; GOSS, E. M. Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. **Medical Mycology**, v. 53, n. 7, p. 674-83, 2015.

SANTOS, C. E. P. et al. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*. **Clinical Vaccine Immunology**, v.18, n. 8, p.1397-1399, 2011.

SANTURIO, J. M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006a.

SANTURIO, J. M. et al. [Indirect ELISA for the serodiagnostic of pythiosis.] Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006b.

SUPABANDHU, J. et al. Isolation Pythium insidiosum from en-vironmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**, v. 46, n. 1, p. 41-52, 2008.

THONGSRI, Y. et al. Evaluation for the Clinical Diagnosis of *Pythium insidiosum* Using a Single-Tube Nested PCR. **Mycopathologia**, v. 176, p. 369–376, 2013.

VANITTANAKOM, N. et al. Identificação de *Pythium insidiosum* humano-patogênico emergente por métodos serológicos e moleculares. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 3970-4, 2004.

WEIBLEN, C. et al. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 126-131, 2016.

ZAMBRANO, C. G. et al. Isolamento e caracterização de espécies de *Pythium* de ambientes aquáticos no Estado do Rio Grande do Sul e avaliação da patogenicidade em modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 5, 2017.

ZANETTE, R. A. et al. Toll deficient Drosophila is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiology Immunology**, v. 57, n. 10, p. 732-735, 2013.

6 Conclusões gerais

Com base nos resultados obtidos neste estudo é possível concluir:

- As amostras de *P. insidiosum* apresentaram perfil proteico similar, independente do hospedeiro avaliado, frente aos diferentes soros de hospedeiros infectados, tais como, equinos, bovinos, caninos e coelhos.
- Os抗ígenos reconhecidos neste estudo apresentaram massas moleculares de ~74 a ~24 KDa. Entretanto, as proteínas consideradas imunodominantes foram ~55-50 KDa e ~34 KDa.
- Os soros dos equinos clinicamente sadios para pitiose avaliados, oriundos de uma região endêmica no RS, que não apresentaram anticorpos anti-*P. insidiosum* sugere-se que são negativos para pitiose. No entanto, 6,18% dos soros apresentaram anticorpos anti-*P. insidiosum*, sugerindo que os equinos foram expostos ao oomiceto.

Referências

ADHIKARI, B. N. et al. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. **PLOS One**, v. 8, n. 10, p. 75072, 2013.

ALEXOPOULOS, C. J. et al. Phylum Oomycota. In: _____. **Introductory Mycology**. 4^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 683-737.

ALFARO, A. A.; MENDOZA, L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 4, p. 295-297, 1990.

ARGENTA, J. S. et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine, alone or in combination, against Brazilian *Pythium insidiosum* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 767-769, feb. 2008.

ARGENTA, J. S. et al. In vitro and in vivo susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v.157, p.137-142, nov. 2012.

AUSTWICK, P. K. C.; COPLAND, J. W. Swamp cancer. **Nature**, v. 250, p. 84, 1974.

AZEVEDO, M. I. et al. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 1-2, p. 141-148, 2012.

BISSONNETTE K. W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal Medical and Veterinary Mycology**, v. 29, n. 1, p. 39-44, set. 1991.

BOSCO, S. M. et al. Human pythiosis, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.

BOTTON, S. A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in Cutaneous Lesions of Brazilian Horses and Rabbits. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1225-1229, 2011.

BRIDGES, C. H.; EMMONS, C. W. A phycomycosis of horses caused by *Hypomyces destruens*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 138, n. 11, p. 579-589, 1961.

CALVANO, T. P. et al. Pythium aphanidermatum Infection following Combat Trauma. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 49, n.10, p. 3710-3713, out. 2011.

CAMUS, A. C. et al. Granulomatous pneumonia caused by Pythium insidiosum in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 567-571, 2004.

CAVALHEIRO, A. S. et al. In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against Pythium insidiosum. **Veterinary Micobiology**, v. 137, p. 408-411, jun. 2009a.

CAVALHEIRO, A. S. et al. In vitro activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against Pythium insidiosum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2136-2138, mai. 2009b.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T. et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, p. 42-45, 2013.

CHAFFIN, M. K. et al. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America:Equine Practice**, v. 11, p. 91-103, 1995.

CHINDAMPORN, A. 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, p. 330-336, 2009.

DE COCK, A. W. et al. Pythium insidiosum sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 344-349, feb.1987.

DO CARMO, P. M. et al. Cutaneous pythiosis in a goat. **Journal of Comparative Pathology**, v.152, n. 2-3, p.103-5, fev/abr. 2015.

DYKSTRA, M. J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**, v. 37, n. 6, p. 427-433, dez. 1999.

FARMER, A. R. et al. Combat-Related Pythium aphanidermatum Invasive Wound Infection: Case Report and Discussion of Utility of Molecular Diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1968-1975, jun. 2015.

FERNANDES, C. P. M. et al. Gastric pythiosis in a dog. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 29, n. 4, p. 235-237, 2012.

FOIL, C. S. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**, v. 23, p. 57-63, 1996.

FONSECA, A. O. et al. In vitro reproduction of the life cycle of *Pythium insidiosum* from kunkers' equine and their role in the epidemiology of pythiosis. **Mycopathologia**, v. 177, n.1-2, p.123-127, feb. 2014.

FONSECA, A. O. et al. In vitro susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some Lamiaceae family species. **Mycopathologia**, v.179, n. 3-4, p. 253-258, abr. 2015a.

FONSECA, A. O. et al. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Veterinary Microbiology**, v.178, n. 3-4, p. 265-269, ago. 2015b.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, n. 1-2, p. 1-16, jul. 2010.

GABRIEL, A. L. et al. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 583-587, 2008.

GAULIN, E.; BOTTIN, A.; DUMAS, B. Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. **Plant Signaling Behav**, v. 5, p. 258-260, 2010.

GONZÁLES, H. E. et al. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutánea empleando yoduro de potasio. **Revista ICA**, v. 14, n. 2, p. 115-122, jun. 1979.

GRECCO, F. B. et al. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 938-942, nov. 2009.

GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 2, p. 147-152, 2002.

GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, p. 695-720, 2003.

GROOTERS, A. M. Pythiosis and Zygomycosis. In: Sellon, D., Long, M. (Eds), Equine Infectious. **Diseases. Saunders Elsevier**, St. Louis, Missouri, USA, p. 412-419, 2007.

HENDRIX, J. W. Indústria de esterol da reprodução e estimulação do crescimento do pítio e da fitophtora. **Ciência**, v. 144, n. 3621, p. 1028-9, 1964.

IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**, v. 70, n. 70, p. 558-560, 1994.

INÊZ-FERREIRA, T. M. et al. A Leishmania murine model to evaluate the immunomodulatory properties of *Pythium insidiosum* proteins. **Heliyon**, v. 3, e00278, 2017.

JESUS, F. P. et al. In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 2, p. 89-93, jun. 2015.

KAGEYAMA, K. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 4, p. 314-326, 2014.

KEOPRASOM, N. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient presenting as bilateral leg ulcers. **Medical Mycology Case Reports**, v. 8, n. 2, p. 25-8, dez. 2012.

KRAJAEJUN, T. et al. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 378-382, 2002.

KRAJAEJUN, T. et al. Ocular pythiosis: is it under-diagnosed? **American Journal of Ophthalmology**, v. 137, p. 370–2, 2004.

KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Disease**, v. 43, p. 569-576, sept. 2006.

KRAJAEJUN, T. et al. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, p. 506-509, 2009.

KRAJAEJUN, T. et al. 74-kiloDalton Immunodominant Antigen of the Pathogenic Oomycete *Pythium insidiosum* is a Putative Exo-1,3- β Glucanase. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 8, p. 1203-1210, ago. 2010.

LEAL, A. B. et al. Pitiosis eqüina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 151-56, 2001.

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

LEDUR, P. C., et al. Dendritic cells pulsed with *Pythium insidiosum* (1,3)(1,6)- β -glucan, Heatinactivated zoospores and immunotherapy prime naïve T cells to Th1 differentiation in vitro. **Immunobiology**, v. 223, n. 3, p. 294-299, mar. 2018.

LOHNOO, T. et al. Efficiency Comparison of Three Methods for Extracting Genomic DNA of the Pathogenic Oomycete *Pythium insidiosum*. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 97, n. 3, p. 342-8, 2014.

LORETO, E. S. et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.7, p. 3588-3590, jul. 2011.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 865-868, set. 2012.

MCMULLAN, W. C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, p. 1293-1297, jun. 1977.

MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*. In: MERZ, W.G., HAY, R.J. (eds). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10^a ed. Oxford: **Medical Mycology**, 2005. p. 617-630.

MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica:Report of 39 cases. **Mycopathologia**, v. 833, n. 94, p. 123-129, 1986.

MENDOZA, L.; MARIN, G. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* De Cock et al. 1987 and its synonym *Pythium destruens* Shipton 1987. **Mycoses**, v. 32, n. 2, p. 73-77, 1989.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, p. 477-486, 2005.

MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v. 104, p. 59-62, 1988.

MENDOZA, L.; VILELA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 198-208, 2013.

MENDOZA, L. et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médical**, v. 6, n. 4, p. 151-164, apr.1996.

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using a enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 715-718, 1997.

MENDOZA, L. et al. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2980-2983, 1992.

MENDOZA, L. et al. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, v. 21, p. 2797-2804, 2003.

MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p. 859 377-382, 1981.

MILLER, R. I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopatologia**, v. 81, p. 23-28, 1983.

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 221-226, 1982.

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**, v. 21, p. 331-341, 1983.

MONTEIRO, A. B. **Imunoterapia da pitiose eqüina:** teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum*. 1999. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 1999.

MOORE-LANDECKER, J. **Fundamentals of the fungi.** 4^a ed. New Jersey: Prentice Hall, Inc., 1996. p. 33-79.

PANNANUSORN, S. et al. Random amplified polymorphic DNA typing and phylogeny of *Pythium insidiosum* clinical isolates in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, v. 38, p. 383-391, 2007.

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

PEREIRA, D. I. B. et al. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 1168-1171, nov. 2007.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-893, mai/jun. 2008.

RAKICH, P. M. et al. Pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 262-269, 2005.

REIS JR., J. L. et al. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 289-295, 2003.

RIBEIRO, E. L. et al. Estudo comparativo e validação de três técnicas de PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico de Peste Suína Africana. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 473-478, 2016.

SALLIS, E. S. V. et al. Pitiose cutânea em eqüinos: 14 casos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 899-903, 2003.

SANTOS, C. E. P. et al. Epidemiological Survey of Equine Pythiosis in the Brazilian Pantanal and Nearby Areas: Results of 76 Cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 270–274, 2014.

SANTURIO, J. M. Cutaneous Pythiosis insidiosi in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 141, p. 123-125, 1998.

SANTURIO, J. M. et al. Three types of immunotherapics against pythiosis insidiosi developed and evaluated. **Vaccine**, v. 21, p. 2535-2540, 2003.

SANTURIO, J. M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006a.

SANTURIO, J. M. et al. [Indirect ELISA for the serodiagnostic of pythiosis.] Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006b.

SCHURKO, A. et al. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and the Americas are explored. **Mycology**, v. 95, p. 200–208, 2003.

SHENEP, J. L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Disease**, v. 27, n. 6, p. 1388-1393, dez. 1998.

SUDJARITRUK, T.; SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 29, n. 11, p. 33, 2011.

TABOSA, I. M. et al. Pitiose cutânea em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 27-30, 1999.

TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 412-415, jul. 2004.

THONGSRI, Y. et al. Evaluation for the Clinical Diagnosis of *Pythium insidiosum* Using a Single-Tube Nested PCR. **Mycopathologia**, v. 176, p. 369–376, 2013.

TRISCOTT, J. A. et al. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 20, n. 3, p. 267-271, jun.1993.

VALENTE, J. S. S. et al. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in its free oil and nanoemulsion formulations against *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v. 181, n. 11-12, p. 865-869, 2016a.

VALENTE, J. S. S. et al. Suscetibilidade in vitro de *Pythium insidiosum* frente às combinações dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*. ***Mycopathologia***, v. 181, n. 7-8, p. 617-622, ago. 2016b.

VALENTE, J. S. S. et al. In vitro activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. ***Journal of Applied Microbiology***, 2016c.

VANITTANAKOM, N. et al. Identificação de *Pythium insidiosum* humano-patogênico emergente por métodos serológicos e moleculares. ***Journal of Clinical Microbiology***, v. 42, n. 9, p. 3970-4, Set. 2004.

VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). ***Medical Mycology***, v. 50, n. 2, p. 219-224, fev. 2012.

WANACHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. ***Vaccine***, v. 22, p. 3613-3621, 2004.

WITKAMP, J. Bijdrage tot de kennis van de Hyphomycosis destruens. ***Ned. Ind. Blad voor Diergeneesk. en Dierenteelt***, v. 36, p. 229-245, 1924.

WITKAMP, J. Het voorkomen van metastasen in de regionaire lymphlieren by Hyphomycosis destruens. ***Ned. Ind. Blad voor Diergeneesk. en Dierenteelt***, v. 37, p. 79-102, 1925.

ZAMBRANO, C. G. et al. Isolamento e caracterização de espécies de *Pythium* de ambientes aquáticos no Estado do Rio Grande do Sul e avaliação da patogenicidade em modelo experimental. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v. 37, n. 5, 2017.

ZANETTE, R. A. et al. Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. ***Journal de Mycologie Médicale***, v. 25, n. 1, p. 91-94, mar. 2015.

Anexos

Anexo A – Oxford University Press License Terms and Conditions

26/04/2018	RightsLink Printable License
OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS	
Apr 26, 2018	
<p>This Agreement between Universidade Federal de Pelotas -- Daniela Pereira ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.</p> <p>License Number 4336060229230</p> <p>License date Apr 25, 2018</p> <p>Licensed content publisher Oxford University Press</p> <p>Licensed content publication Medical Mycology</p> <p>Licensed content title Protein profile of Brazilian <i>Pythium insidiosum</i> isolates</p> <p>Licensed content author Dal Ben, Vanessa; Oliveira, Rômulo S</p> <p>Licensed content date Oct 9, 2017</p> <p>Type of Use Thesis/Dissertation</p> <p>Institution name Universidade Federal de Pelotas</p> <p>Title of your work Protein profile of Brazilian <i>Pythium insidiosum</i> isolates</p> <p>Publisher of your work Universidade Federal de Pelotas</p> <p>Expected publication date May 2018</p> <p>Permissions cost 0.00 USD</p> <p>Value added tax 0.00 USD</p> <p>Total 0.00 USD</p> <p>Title Protein profile of Brazilian <i>Pythium insidiosum</i> isolates</p> <p>Instructor name Daniela Isabel Brayer Pereira</p> <p>Institution name Universidade Federal de Pelotas</p> <p>Expected presentation date May 2018</p> <p>Portions Text (abstract, introduction, material and methods, results, discussion, conclusion, references. Table 1 and 2; figure 1 and 2)</p> <p>Requestor Location Universidade Federal de Pelotas Campus Capão do Leão, 18, sala 14</p>	

26/04/2018

RightsLink Printable License

Pelotas, Rio Grande do Sul 96100000
 Brazil
 Attn: Universidade Federal de Pelotas

Publisher GB125506730
 Tax ID

Billing Type Invoice

Billing Address Universidade Federal de Pelotas
 Campus Capão do Leão, 18, sala 14

Pelotas, Brazil 96100000
 Attn: Universidade Federal de Pelotas

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org. Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms

26/04/2018

RightsLink Printable License

and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

12. Other Terms and Conditions:

v1.4

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.