

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Proteínas imunorreativas de *Conidiobolus lamprauges* e variabilidade genética de
isolados clínicos de ovinos naturalmente infectados.**

Maria Cristina da Silva

CUIABÁ
2015

Proteínas imunorreativas de *Conidiobolus lamprauges* e variabilidade genética de isolados clínicos de ovinos naturalmente infectados.

Maria Cristina da Silva

Orientador: Prof. Dra. Valéria Dutra

Co-Orientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde, Área de concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais.

CUIABÁ

2015

Banca Examinadora:

Orientadora:

Dra. Valéria Dutra

Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)

Co-orientador:

Dr. Luciano Nakazato

Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)

Examinadores Externos:

Dra. Sônia de Avila Botton

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Dra. Daniela Isabel Brayer Pereira

Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Examinadores Internos:

Dra. Rosane Christine Hahn

Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)

Dr. Richard de Campos Pacheco

Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)

Suplente:

Dr. Francisco José Dutra Souto

Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

D111p da Silva, Maria Cristina.
Proteínas imunorreativas de *Conidiobolus lamprauges* e
variabilidade genética de isolados clínicos de ovinos naturalmente
infectados / Maria Cristina da Silva. -- 2015
53 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Valéria Dutra.
Co-orientador: Luciano Nakazato.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Cuiabá, 2015.
Inclui bibliografia.

1. *Conidiobolus lamprauges*. 2. ovinos. 3. antígenos
imunorreativos. 4. RAPD. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular Veterinária da Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT. Recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Mato Grosso.

Dedico este trabalho...

*À minha mãe Maria de Lourdes pelo amor
incondicional... mãe você é meu maior exemplo
sempre.*

Ao meu pai Estenio pela presença, apoio e amor.

*Ao meu irmão Carlos Humberto e a minha cunhada
Ana Claudia.*

Aos meus amados furacões Carlos Henrique, Ana Beatriz e Maria Luisa.

Ao Marcelo pelo incentivo, desafios... e pelo amor.

Amo imensamente vocês!

*Ando devagar por que já tive pressa
E levo esse sorriso por que já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Nada sei*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando dias pela longa estrada eu vou
Estrada eu sou*

*É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir*

*Todo mundo ama um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz*

*É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,*

*Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz...*

Almir Sater

Agradecimento Especial

*À profa Valéria, por ter me permitido sonhar...
a sra sabe o quanto a admiro e respeito... pela força,
dedicação e acima de tudo por ser essa pessoa de
coração tão generoso...*

*Ao Prof. Luciano agradeço pelas oportunidades, pela
generosidade e enorme paciência.*

Muito obrigada !!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas bênçãos, oportunidades e por não deixar que desistisse frente às provas da vida.

A minha amada família pelo apoio, ensinamentos, torcida e carinho. Em especial aos meus queridos tios Benedito Viana, Josefina Viana e Osvaldo Viana.

A família Takagi pelo carinho e respeito.

A Isabela Godoy pela paciência e disposição em ajudar nos momentos mais críticos dessa caminhada de descobertas do “mundo *Conidiobolus*”. Isa obrigada pela amizade, carinho e por estender a mão de forma tão generosa.

Aos queridos amigos Luciana Guimarães, Roberto Lopes, Rosa Helena Ferraz e Richard Pacheco agradeço pela amizade, torcida e pelos agradáveis momentos de convivência.

Aos amigos Marcelo Silveira e Janaína Assunção pelas boas risadas e por compartilharem as pérolas da música brasileira durante as jornadas de trabalho nos laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular Veterinária.

Aos colegas dos Laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular Veterinária pela ajuda e convivência.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UFMT (HOVET) em especial a querida dona Ednéia Leite pela espontaneidade das palavras e pelo carinho.

Aos colegas do Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT) pelo apoio. Em especial ao amigo Leandro Miranda pela amizade, colaboração e companheirismo.

Aos docentes, funcionários e colegas da Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo financiamento do projeto.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a concretização deste trabalho.

*Uma pessoa é gigante pra você quando se
interessa pela sua vida, quando busca alternativas
para o seu crescimento, quando sonha junto.*

*Uma pessoa é grande quando perdoa, quando
compreende, quando se coloca no lugar do outro,
quando age não de acordo com o que esperam
dela, mas de acordo com o que espera de si
mesma...*

Martha Medeiros

RESUMO

O estudo de conidiobolomicose ovina tem sido realizado nos seus aspectos clínicos, epidemiológicos, patológicos e moleculares. Entretanto, informações sobre a resposta imune do hospedeiro na infecção por *Conidiobolus lamprauges* e da variabilidade genética da espécie são escassos. O presente trabalho descreve a identificação de proteínas imunorreativas de *C. lamprauges* pela técnica de *western blot* onde foram identificadas doze bandas reativas, com massas moleculares variando de 35 a 198 kDa. Dentre estas, a proteína de 198 kDa reativa em três soros de ovinos e a de 53 kDa que apresentou a maior intensidade comparativamente com outras bandas, sendo provavelmente imunodominante. Através da análise da variabilidade genética de sete isolados de *C. lamprauges* oriundos de casos clínicos de conidiobolomicose de diferentes regiões do Brasil pela técnica de *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) houve padrões de amplificações variados sendo observadas de 4 a 17 *amplicons*. Ao analisar os perfis gerados foi observada variabilidade genética entre os isolados, sendo possível a separação em cinco grupos representativos em relação à forma clínica da doença e a origem geográfica. Os dados gerados podem contribuir para o entendimento dos mecanismos patogênicos e de resposta imune do hospedeiro e sobre os aspectos eco-epidemiológicos de *C. lamprauges*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. <i>Conidiobolus</i> spp.	16
2.2. Conidiobolomicose	17
2.2.1. Epidemiologia	17
2.2.2. Patogenia.....	18
2.2.3. Conidiobolomicose em humanos	20
2.2.4. Conidiobolomicose em ovinos.....	21
2.3. Diagnóstico	22
2.3.1. Métodos imunológicos.....	23
2.4. Métodos de tipificação molecular	23
2.5. Tratamento	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO GERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
APÊNDICE A – ARTIGOS CIENTÍFICOS	35
ARTIGO 1- Proteínas imunorreativas de <i>Conidiobolus lamprauges</i> isoladas de ovinos infectados naturalmente	36
ARTIGO 2- Genetic variability of <i>Conidiobolus lamprauges</i> fungi isolates from sheep by RAPD.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent assay</i>
g	Grama
IgG	Imunoglobulina G
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
kDa	Quilodalton
M	Molar
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
PBS	Tampão salina fosfato
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
qsp	Quantidade suficiente para
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis</i>
spp	Espécies
x g	Força G
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Zigomicoses são micoses invasivas causadas por fungos pertencentes à classe dos zygomycetes, ordens *Mucorales* e *Entomophthorales*. Dentro dessa última, *Conidiobolus coronatus*, *Conidiobolus incongruus*, *Conidiobolus lamprauges*, vêm sendo descritos como agentes da conidiobolomicose, micose granulomatosa de importância médica e veterinária crescente (GUGNANI, 1992; RIBES et al., 2000; SILVA et al., 2007a; TADANO et al., 2005; VILELA et al., 2010; KIMURA et al., 2011; ISA-ISA et al., 2012; BACHELET et al., 2014).

Conidiobolus spp. são considerados sapróbios, comumente encontrados no solo e em restos vegetais em decomposição, que podem parasitar várias espécies de artrópodos, entre esses insetos e aranhas (MORAES et al., 1997; RIBES et al., 2000; TADANO et al., 2005). A infecção no homem e nos animais domésticos está frequentemente associada à rinite granulomatosa e ocorre possivelmente pela implantação de esporos inalados ou através de lesões dermatológicas causadas por insetos infectados com conídios (MORAES et al., 1997; RIBES et al., 2000; TADANO et al., 2005; SILVA et al., 2007a). A infecção ocorre, em geral, na ausência de imunodepressão, todavia, há relatos da infecção em indivíduos imunocomprometidos (CARRIGAN et al., 1992; WALKER et al., 1992; MORAES et al., 1997; STEPHENS & GIBSON, 1997; RIBES et al., 2000; BOONSAGSUK et al., 2001; KIMURA et al., 2011).

Embora, *Conidiobolus* spp. sejam cosmopolitas, casos da conidiobolomicose historicamente têm sido descritos em áreas tropicais e subtropicais em humanos e animais (RIBES et al., 2000). *C. coronatus* e *C. incongruus* são consideradas espécies de maior relevância epidemiológica nos casos de conidiobolomicose (RIBES et al., 2000), contudo, *C. lamprauges* vêm despertando interesse da comunidade científica em casos de rinite e de infecção disseminada em humanos (SILVA et al., 2007a; De PAULA et al., 2010; KIMURA et al., 2011).

A conidiobolomicose no Brasil tem sido documentada em humanos e animais, com maior ocorrência da doença em estados do Nordeste (JOHNSTON et al., 1967; ANDRADE et al., 1967; COSTA et al., 1991; MORAES et al., 1994; VALLE et al., 2001; COSTA et al., 2004; TADANO et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2006; SILVA et al., 2007a), no entanto, casos de conidiobolomicose vêm ocorrendo no Mato Grosso, Pará, São Paulo e no Sul do

Brasil (MORAES et al., 1994; CASTRO e SOUZA FILHO et al., 1992; TADANO et al., 2005; BOABAID et al., 2008; PEDROSO et al., 2009).

Surtos da conidiobolomicose ovina no Brasil têm ocorrido em rebanhos das regiões Nordeste (SILVA et al., 2007a; RIET-CORREA et al., 2008), Centro-Oeste (BOABAID et al., 2008; De PAULA et al., 2010) e Sul do País (PEDROSO et al., 2009; FURLAN et al., 2010) sendo descritos como um problema sanitário grave acarretando perdas econômicas consideráveis aos produtores nessas regiões. Casos da doença por *C. lamprauges* vêm sendo identificados nos estados de Mato Grosso (De PAULA et al., 2010, UBIALI et al., 2013, SILVEIRA et al., 2013), Piauí (SILVA et al., 2007a; VILELA et al., 2010) e Santa Catarina (FURLAN et al., 2010). Na espécie ovina, a doença caracteriza-se pelo desenvolvimento de quadro de rinite granulomatosa que pode ocorrer de duas formas clínicas: rinofaríngea e rinofacial (KETTERER et al., 1992; MORRIS et al., 2001; SILVA et al., 2007a; BOABAID et al., 2008; CÂMARA et al., 2011).

Até o momento, a patogenia da conidiobolomicose não está esclarecida. No entanto, *Conidiobolus* spp. Produzem *in vitro* várias enzimas associadas com a proteólise facilitando o processo de invasão e disseminação tecidual (GUGNANI, 1992). Estudos recentes sugerem que *C. lamprauges* possui fatores de virulência relacionados à termotolerância (SILVA et al., 2012; GODOY et al., 2014). Dessa forma, há necessidade de estudos para um melhor entendimento do papel das proteínas termotolerantes na patogenia e virulência do fungo. Diante das informações, a identificação de antígenos que apresentem características imunogênicas, específicas, durante a infecção por *C. lamprauges* poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos patogênicos e de virulência que desencadeiam uma resposta imune no organismo do hospedeiro. Além disso, estudos como os de variabilidade genética são importantes diante da carência de informações da epidemiologia molecular de *C. lamprauges*.

Assim, diante do exposto e considerando a importância da conidiobolomicose, o presente trabalho objetivou: (1) identificar proteínas imunorreativas de *C. lamprauges*, através da técnica de *western blot*; (2) estudar a variabilidade genética dos isolados pela técnica de *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Conidiobolus* spp.

Zigomicoses são infecções causadas por fungos pertencentes à classe dos *Zygomycetes*, a qual é subdividida em duas ordens *Mucorales* e *Entomophthorales*. Com base em estudos de filogenia molecular foi proposta nova classificação dos *Entomophthorales* (grego *entomon*, insetos) no filo *Entomophthoromycota*, classe dos *Entomophthoromycetes* (HUMBER et al. 2012; GRYGANSKYI et al. 2012). A ordem *Entomophthorales* inclui o gênero *Conidiobolus* com mais de 70 espécies descritas atualmente no MycoBank (2015). Dessas, *Conidiobolus coronatus*, *Conidiobolus incongruus* e *Conidiobolus lamprauges* são as principais espécies de importância médica e veterinária e estão frequentemente associadas a quadros de rinite granulomatosa crônica no homem e em várias espécies de animais (HUMBER et al., 1989; CARRIGAN et al., 1992; WALSH et al., 1994; TADANO et al., 2005; VILELA et al., 2010; KIMURA et al., 2011; ISA-ISA et al., 2012; BACHELET et al., 2014; MACKEY et al., 2015).

A distribuição de *Conidiobolus* spp. é mundial e o seu habitat natural está associado ao solo e a água sendo este micro-organismo considerado um saprófito tendo restos vegetais em decomposição como a principal fonte de nutrientes (HUMBER et al., 1989; CARRIGAN et al., 1992; GROOTERS et al., 2003). Estes são conhecidos como patógenos de insetos, sendo em determinadas ocasiões utilizadas no controle biológico dos mesmos (GUGNANI 1992; MORAES et al., 1997; CHEN et al., 2014). Embora encontrados em todo mundo, ocorrem preferencialmente em regiões de clima tropical e subtropical, áreas quentes e de alta umidade que favorece a sobrevivência do fungo no ambiente (CARRIGAN et al., 1992; GUGNANI, 1992).

Conidiobolus spp. são termofílicos, crescem a temperatura de 22 a 37 °C e podem ser cultivados em meios micológicos padrões como Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) 2% e Ágar Batata Dextrose (PDA) 2% (RIBES et al., 2000; VALLE et al., 2001). Em SDA, as colônias apresentam-se esbranquiçadas ou pigmentadas (amareladas), aderidas ao meio e de aspecto enrugado com formação de colônias satélites. No cultivo em PDA, as colônias são planas, lisas de aspecto seroso com formação de uma prega central. Microscopicamente apresentam hifas cenocíticas, com raros septos e ramificações irregulares com presença de conídios esféricos (14-22µm) de paredes finas e papilas proeminentes (MORRIS et al., 2001; VILELA

et al., 2010). Baseado em características morfológicas e nas estruturas reprodutivas é possível fazer a diferenciação entre as três principais espécies patogênicas (VILELA et al., 2010).

2.2. Conidiobolomicose

2.2.1. Epidemiologia

A conidiobolomicose foi descrita pela primeira vez por Emmons & Bridges, com o isolamento de *C. coronatus*, em 1961 nos EUA em um equino com lesão granulomatosa nasal. Em 1963, foi relatado o primeiro caso da infecção em humano nas Antilhas (BRAS et al., 1963). No Brasil, o primeiro caso foi em um muar no estado de São Paulo (JOHNSTON et al., 1967), enquanto que a primeira descrição em humano foi em 1967 na Bahia (ANDRADE et al., 1967). Em ovinos, os primeiros relatos da conidiobolomicose em rebanho brasileiro ocorreram em 2007 no estado do Piauí (SILVA et al., 2007a). Desde então, a conidiobolomicose ovina vem sendo relatada em diferentes estados brasileiros (SILVA et al., 2007a; RIET-CORREA et al., 2008; PEDROSO et al., 2009; FURLAN et al., 2010). No estado de Mato Grosso, casos de conidiobolomicose humana e ovina já foram descritos (TADANO et al., 2005; BOABAID et al., 2008).

Embora as espécies de *Conidiobolus* spp. possam ser encontrados como micro-organismos ambientais em todo mundo, casos da conidiobolomicose historicamente têm sido descritos em áreas tropicais e subtropicais (RIBES et al., 2000; HIBBERT et al., 2007). O modo de transmissão de *Conidiobolus* spp. não está bem esclarecido. No entanto, acredita-se que o fungo infecte os seus hospedeiros através da inalação de conídios ambientais que se alojam na cavidade nasal, pela implantação traumática de conídios por picadas de insetos ou por inoculação direta dos esporos em microlesões provocadas por plantas pontiagudas (GUGNANI, 1992, CARRIGAN et al., 1992; KETTERER et al., 1992; RIBES et al., 2000; TADANO et al., 2005). O fungo tem predileção pelo trato respiratório superior (infecção primária) que se manifesta clinicamente como uma infiltração granulomatosa crônica da mucosa nasal. O curso da doença é determinado pela resposta imune do hospedeiro, no entanto, se a resposta não for adequada pode ocorrer a disseminação para outros órgãos e sistemas (KETTERER et al., 1992; RIBES et al., 2000; TADANO et al., 2005; SILVA et al., 2007a).

A doença vem sendo descrita em humanos (BUSAPAKUN et al., 1983; VALLE et al., 2001; TADANO et al., 2005; KIMURA et al., 2011; BACHELET et al., 2014) e em várias espécies de animais como equinos (MENDONZA & ALFARO, 1985; HUMBER et al., 1989; ZAMOS et al., 1996), cervos (STEPHENS & GIBSON, 1997; MADSON et al., 2009), ovinos (CARRIGAN et al., 1992; KETTERER et al., 1992; MORRIS et al., 2001; SILVA et al., 2007a; BOABAID et al., 2008), cães (BAUER et al., 1997; GROOTERS, 2003; MACKEY et al., 2015), golfinhos (MEDWAY, 1980), lhamas (MOLL et al., 1992; FRENCH & ASHWORTH, 1994) e primata (ROY & CAMERON, 1972) em regiões tropicais e subtropicais.

C. coronatus e *C. incongruus* são consideradas espécies de maior relevância epidemiológica sendo amplamente estudadas em seus aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos (RIBES et al., 2000). Contudo, observa-se *C. lamprauges* em lesões granulomatosas de equino (HUMBER et al., 1989), em casos clínicos de rinite micótica granulomatosa em ovinos (CARRIGAN et al., 1992; SILVA et al., 2007a; BOABAID et al., 2008; VILELA et al., 2010) e em infecção disseminada em humanos (KIMURA et al., 2011). Em Mato Grosso, as espécies *C. coronatus* e *C. lamprauges* foram descritas em humanos e ovinos respectivamente (TADANO et al., 2005; BOABAID et al., 2008; De PAULA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2013; UBIALI et al., 2014).

2.2.2. Patogenia

Há diversos aspectos a serem elucidados referentes a patogenia das infecções determinadas por *Conidiobolus* spp. Todavia, diferentes enzimas produzidas por *Conidiobolus* spp. Foram identificadas em sistemas *in vitro*, incluindo: elastases, esterases, collagenases, lipases e quitinases envolvidas na patogênese da infecção pelo fungo (GUGNANI, 1992; FREIMOSER et al., 2003; CHARNLEY, 2003; BANIA et al., 2006; BOGUS et al., 2010; WIELOCH et al., 2011).

Estudos realizados em cutícula de insetos sugerem a superexpressão de genes associados à proteólise, principalmente do tipo subtilisina e tripsina, que degradam a cutícula. Estes genes podem estar associados ao processo de invasão tecidual local facilitando a disseminação no hospedeiro por fornecer nutrientes, como aminoácidos necessários para o crescimento do fungo após a invasão. Estudos sugerem que algumas lipases secretadas podem hidrolisar ácidos graxos presentes em tecidos subcutâneos e as collagenases podem

facilitar invasão do tecido muscular. Outros genes associados ao metabolismo de carboidratos também estavam aumentados sugerindo que o crescimento rápido seja um fator importante para o estabelecimento da infecção no hospedeiro (GUGNANI 1992; FREIMOSER et al., 2003; CHARNLEY, 2003; KENDRA & BOGUS, 2006; BANIA et al., 2006; BOGUS et al., 2010; WIELOCH et al., 2011).

É conhecido que alguns fungos patogênicos como *Paracoccidioides brasiliensis* e *Cryptococcus neoformans* (KRAUS et al., 2004, ROSA e SILVA et al., 2008) regulam o seu perfil de genes expressos de acordo com as condições a que são submetidos. Estudos têm sido realizados no sentido de identificar possíveis determinantes de virulência de *C. lamprauges* associados à capacidade de termo resistência em diferentes temperaturas (SILVA et al., 2012; GODOY et al., 2014). Assim, foi identificada a superexpressão do gene que codifica a enolase sugerindo que essa enzima metabólica possa estar associada à resposta adaptativa do fungo a tolerância térmica (SILVA et al., 2012). Outro estudo analisou o crescimento *in vitro* de isolados de *C. lamprauges* em diferentes temperaturas e comparou o perfil de expressão diferencial das proteínas, sendo observada que a temperatura ótima de crescimento é de 35°C. Na análise de expressão diferencial de proteínas, foram encontrados 16 *spots* diferencialmente expressos, sete com expressão diminuída e nove com expressão aumentada a 37°C, quando comparado à condição de 28°C (GODOY et al., 2014). Dessa forma, esses estudos sugerem que *C. lamprauges* produza fatores de virulência relacionados à termorregulação possivelmente com papel importante na patogênese da doença.

Na infecção por zigomicetos, os neutrófilos desempenham papel crucial na fagocitose do fungo nos estágios iniciais da infecção, apesar do tamanho dos elementos das hifas e a sua incapacidade de serem fagocitadas por células inflamatórias, os neutrófilos são capazes de desencadear resposta imunológica no hospedeiro, eliminando o fungo. Os neutrófilos são atraídos por fatores quimiotáticos, que são gerados após a ativação do sistema complemento, pelas hifas e usando o seu sistema citotóxico oxidativo, são capazes de causar danos nas estruturas fúngicas (LACAZ et al., 1991; RIBES, et al., 2000).

Histologicamente o quadro é de inflamação crônica granulomatosa multifocal, com área de necrose caseosa, presença de macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células epitelióides e células gigantes. São observadas hifas largas envoltas por formações radiadas características da reação de Splendore-Hoeppli (CARRIGAN et al., 1992; GUGNANI, 1992; MORRIS et al., 2001; SILVA et al., 2007a).

A literatura não apresenta dados de resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção por *C. lamprauges*.

2.2.3. Conidiobolomicose em humanos

A conidiobolomicose humana está descrita em regiões de clima tropical e subtropical particularmente na África, América do Sul e Ásia (BRAS et al., 1965; GUGNANI, 1992; MORAES et al., 1994; RIBES et al., 2000; SHARMA et al., 2003; MICHAEL et al., 2009; YANG et al., 2009; BENTO et al., 2010). No Brasil, a maior prevalência da doença está na região Nordeste (COSTA et al., 1991; MORAES et al., 1994; VALLE et al., 2001; COSTA et al., 2004; BITTENCOURT et al., 2006). Existem relatos também nos estados do Pará (MORAES et al., 1994; MORAES et al., 1997; MIGUITA e SOUZA et al., 2014), São Paulo (CASTRO e SOUZA FILHO et al., 1992), e Mato Grosso (TADANO et al., 2005).

C. coronatus é o principal agente patogênico da conidiobolomicose em humanos e tem sido descrito em casos de infecções localizadas e disseminadas (JAFFEY et al., 1990; MORAES et al., 1994; VALLE et al., 2001; TADANO et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2006; FISCHER et al., 2008; MICHAEL et al., 2009; SUBRAMANIAN & SOBEL, 2011; JAYAWICKRAMA et al., 2012; BACHELET et al., 2014), entretanto, *C. incongruus* têm sido descrito em casos de infecções invasivas em humanos (BUSAPAKUM et al., 1983; WALSH et al., 1994; STEPHENS & GIBSON, 1997; SHARMA et al., 2003; MADSON et al., 2009). Em 2011, *C. lamprauges* foi descrito como patógeno humano em um caso de micose disseminada no Japão (KIMURA et al., 2011).

A maioria dos indivíduos infectados por *Conidiobolus* spp. são do sexo masculino, principalmente trabalhadores rurais possivelmente pela característica saprofítica do fungo, e o número de casos em homens superam os observados em mulheres numa proporção de 10:1 (LEOPAIRUT et al., 2010). Acomete principalmente adultos, sendo raros os relatos em crianças e adolescentes (GUGNANI, 1992; MIGUITA E SOUZA et al., 2014). A doença vem sendo descrita em indivíduos imunocompetentes (JAYAWICKRAMA et al., 2012; ISA-ISA et al., 2012; BACHELET et al., 2014), contudo há relatos, da infecção em imunocomprometidos, como pacientes HIV-positivos (BOONSAGSUK et al., 2001), transplantados (WALKER et al., 1992) e oncológicos (KIMURA et al., 2011).

A manifestação clínica em humanos inicia com tumefação da mucosa do turbinado inferior podendo disseminar para os tecidos faciais levando ao comprometimento da boca,

pálpebras pela formação de nódulos subcutâneos firmes e indolores que levam a deformação da face (GUGNANI, 1992; MORAES et al., 1997; TADANO et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2006).

2.2.4. Conidiobolomicose em ovinos

A conidiobolomicose ovina ocorre principalmente, em países de clima tropical como Austrália, Trinidad Tobago e Brasil (KETTERER et al., 1992; CARRIGAN et al., 1992; MORRIS et al., 2001; SILVA et al., 2007b). No Brasil, casos da doença vêm sendo descritos nos estados do Piauí (SILVA et al., 2007a), Paraíba (RIET-CORREA et al., 2008), Mato Grosso (BOABAID et al., 2008), Rio Grande do Sul (PEDROSO et al., 2009) e Santa Catarina (FURLAN et al., 2010) sendo um problema sanitário grave acarretando perdas econômicas consideráveis aos produtores.

No estado de Mato Grosso, os surtos da conidiobolomicose foram associados a *C. lamprauges* (De PAULA et al., 2010; UBIALI et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013), assim como no Piauí (SILVA et al., 2007a) e Santa Catarina (FURLAN et al., 2010; VILELA et al., 2010).

Baseado em dados epidemiológicos, a ocorrência da enfermidade é sazonal ocorrendo principalmente no período chuvoso e de altas temperaturas (SILVA et al., 2007b; BOABAID et al., 2008). Por outro lado, surtos da doença também foram observados no período seco na região semiárida do Nordeste brasileiro (AGUIAR et al., 2014). A associação de fatores como hábitos de pastejo dos animais, pastejo constante às margens de açudes com matéria vegetal decomposta e solo rico em matéria orgânica expõe os animais à infecção por *Conidiobolus* spp. e predispõem a ocorrência de focos da doença (SILVA et al., 2007b; AGUIAR et al., 2014). Estudos sugerem que não é necessária depressão imunológica para o estabelecimento da infecção em ovinos (KETTERER et al., 1992; AGUIAR et al., 2014).

Nesta espécie a doença cursa com quadro de rinite granulomatosa que pode ocorrer de duas formas clínicas: rinofaríngea e rinofacial (KETTERER et al., 1992; MORRIS et al., 2001; SILVA et al., 2007a; BOABAID et al., 2008; CÂMARA et al., 2011). A forma rinofaríngea se caracteriza por alterações na região etmoidal, faringe, ossos turbinados, seios paranasais, palato duro e mole com presença de massa nodular, de coloração amarelada ou branca e necrose da região etmoidal. Nesta forma, as lesões se estendem para os seios nasais, placa cribiforme podendo invadir a órbita ocular e o cérebro (KETTERER et al., 1992;

MORRIS et al., 2001; BOABAID et al., 2008; RIET-CORREA et al., 2008). Na forma rinofacial são observadas lesões ulceradas na mucosa nasal e no palato duro associadas ao aumento de volume na região do vestíbulo nasal, união muco-cutânea do nariz e da pele da região da face e lábio superior (SILVA et al., 2007a; RIET-CORREA et al., 2008). A enfermidade em ovinos deve ser diferenciada da rinite ocasionada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* que frequentemente afeta o tecido subcutâneo, vestíbulo nasal e palato duro, sendo denominada rinite rinofacial (BOABAID et al., 2008; UBIALI et al., 2013).

A infecção, em alguns casos, pode disseminar para diversos órgãos como linfonodos, pulmão, coração, rim e cérebro (CARRIGAN et al., 1992; SILVA et al., 2007b). Clinicamente os animais apresentam apatia, febre, anorexia, perda de peso, tumefação nasal, exoftalmia unilateral, assimetria crânio-facial, descarga nasal muco-hemorrágico, dispnéia, aumento da frequência cardio-respiratória e morte (MORRIS et al., 2001; KETTERER et al., 1992; CARRIGAN et al., 1992; RIET-CORREA 2008; SILVA et al., 2007a; SILVA et al., 2007b; SILVA et al., 2010).

A incidência da enfermidade é baixa atingindo em alguns casos 2,80% da população. A mortalidade, entretanto, é de 100% e atinge animais de todas as idades (CARRIGAN et al., 1992; KETTERER et al., 1992; MORRIS et al., 2001; SILVA et al., 2007b; AGUIAR et al., 2014). O curso clínico e a morte dos animais acometidos estão relacionados a possíveis fatores de virulência do fungo, susceptibilidade do hospedeiro e ausência de tratamento (SILVA et al., 2007b).

2.3. Diagnóstico

O diagnóstico da conidiobolomicose baseia-se em achados epidemiológicos, clínico-patológicos associados ao isolamento do fungo em cultivo. A classificação definitiva é realizada por técnicas moleculares (RIBES et al., 2000). Nesse contexto, a conidiobolomicose ovina por *C. lamprauges* tem sido relatada através do isolamento do agente (SILVA et al., 2007a; BOABAID et al., 2008), por técnicas moleculares, como reação em cadeia da polimerase (PCR) (De PAULA et al., 2010; VILLELA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2013; UBIALI et al., 2013), análise de diferença representacional (RDA) (SILVA et al., 2012), imuno-histoquímica (UBIALI et al., 2013) e recentemente através da expressão diferencial de proteínas através de eletroforese bidimensional (2D) (GODOY et al., 2014).

2.3.1. Métodos imunológicos

Antígenos fúngicos estimulam no homem ou em animais infectados a produção de anticorpos, geralmente imunogênicos, isto é, que tem a capacidade de estimular a formação de anticorpos e de combinar, de modo específico, com os anticorpos formados contra ele (LACAZ et al., 1991). A identificação dos diferentes antígenos expressos pelos fungos pode levar ao conhecimento dos mecanismos de patogenicidade desencadeados durante a infecção abrindo novas perspectivas para entendimento da doença (BLANCO & GARCIA, 2000). As reações de antígeno-anticorpo podem ser detectadas através de métodos imunológicos, como as reações de aglutinação, reações de precipitação, fixação de complemento, técnicas imunoenzimáticas, imunoeletroforese e de imunofluorescência (LACAZ et al., 1991). Com o objetivo de identificar reações de antígeno-anticorpo, diversas técnicas sorológicas foram testadas na detecção da conidiobolomicose, dentre essas imunodifusão em gel de agar (ID), *immunoblot* e a imuno-histoquímica (MENDONZA & ALFARO, 1985; KAUFMAN et al., 1990; RIBES et al., 1992; GUGNANI, 1992; MENDONZA et al., 1992).

Kaufman et al. (1990) demonstraram a sensibilidade e especificidade do teste de ID na diferenciação das zigomicoses causadas por *Basidiobolus ranarum* e *C. coronatus*, como para pitiose (*P. insidiosum*) em amostras de animais e humanos.

O método imuno-histoquímico, também foi utilizado como técnica para avaliar a diferenciação das infecções por *C. lamprauges* e *P. insidiosum* em amostras histopatológicas de ovinos com quadro de rinite micótica, os dados obtidos demonstraram bons resultados na diferenciação das duas doenças (UBIALI et al., 2013).

Em 1992, Mendoza et al. desenvolveram a técnica de *western blot* buscando identificar antígenos imunodominantes de *P. insidiosum* em amostras de soros de equinos obtidos durante a infecção, a técnica detectou antígenos imunogênicos específicos, entretanto, um antígeno de 44kDa reagiu de forma cruzada com antígeno de *C. coronatus* não sendo esclarecida a relação antigênica.

2.4. Metodo de Tipificação Molecular

Algumas técnicas têm sido utilizadas para a tipificação molecular de *Conidiobolus* spp. baseada no padrão de *amplicons* incluindo RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA* e na região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do fungo.

As regiões ITS, dividida em ITS 1 e ITS 2, evoluem rapidamente sendo regiões apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie (HILLIS & DIXON, 1991). A técnica de RAPD baseia-se na utilização de iniciadores curtos de sequência arbitrária que detecta polimorfismos no DNA. A vantagem deste método é que não há necessidade de se conhecer a sequência genômica gerando assim, padrões de *amplicons* que podem ser analisados filogeneticamente (WILLIAMS et al., 1990). Esta técnica vem sendo empregada em estudos da variabilidade genética intra e interespecíficas de vários organismos incluindo fungos, dos gêneros *Paracoccidioides* (SOARES et al., 1995; HAHN et al., 2003; JOÃO BATISTA JUNIOR et al., 2013), *Malassezia* (CASTELLA et al., 2005; GANDRA et al., 2006; DUARTE et al., 2009), *Cryptococcus* (HORTA et al., 2002; ANDRADE-SILVA et al., 2012; PEDROSO et al., 2012) procurando determinar as similaridades e as diferenças entre isolados de diferentes hospedeiros, origem geográfica e fontes de infecção.

No estudo de Peres-Martinez et al. (2012), as técnicas de RAPD e PCR-ITS foram padronizadas para investigar a variabilidade genética intra-específica entre isolados de *C. coronatus*, evidenciando 48 fragmentos polimórficos com variação genética entre os isolados analisados, os quais foram agrupados de acordo com a sua origem: inseto, composto orgânico, solo e humanos. Os autores observaram que isolados obtidos de lesões em humanos apresentaram maior variabilidade em relação aos isolados obtidos de outras fontes.

Estudos da variabilidade genética de *C. lamprauges* ainda são inexistentes.

2.5. Tratamento

A conidiobolomicose vem ganhando importância pela dificuldade no tratamento em função da baixa resposta terapêutica a maioria dos antifúngicos disponíveis. O tratamento da infecção por *Conidiobolus* spp. em humanos e animais é baseado na administração de iodetos e antifúngicos, como anfotericina B, flucitocina, terbinafina e triazóis utilizados isoladamente ou em combinações com diferentes graus de sucesso (GUGNANI, 1992; KETTERER et al., 1992; BOABAID et al., 2008; KIMURA et al., 2011; ISA-ISA et al., 2012; TONDOLO et al., 2013).

Tondolo et al. (2013) avaliaram a susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *C. lamprauges*, os quais demonstraram susceptibilidade dos isolados à terbinafina e resistência aos triazóis, anfotericina B e resistência a equinocandina.

Procedimentos cirúrgicos também são realizados para a retirada dos nódulos e na reconstrução facial em humanos (RIBES et al., 2000; VALLE et al., 2001).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar proteínas imunorreativas de *Conidiobolus lamprauges* de isolados de ovinos infectados e detectar a presença de variabilidade genética de isolados clínicos através da técnica de RAPD.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar o extrato proteico de *C. lamprauges*;
- Padronizar a técnica de ELISA para a quantificação de anticorpos frente a proteínas de *C. lamprauges*;
- Identificar antígenos de *C. lamprauges* envolvidas na resposta imunológica;
- Avaliar a variabilidade genética dos isolados de *C. lamprauges*.

4. REFERÊNCIAS

ANDRADE, Z. A. et al. Nasal granuloma caused by *Entomophthora coronatus*. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 16, p. 31-33, 1967.

ANDRADE-SILVA, L. et al. RAPD analysis with the primer L15996 of Brazilian Clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 53-59, 2012.

AGUIAR, G. M. N. et al. Aspectos epidemiológicos da conidiobolomicose em ovinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 12, p. 2210-2216, 2014.

BACHELET, J. T. et al. Infection a *Conidiobolus coronatus* revelee par une tumeur de la face. **Revue Stomatologieet de Chirurgie Maxillofaciale et de Chirurgie Orale**, v. 115, n. 2, p. 114-117, 2014.

BANIA, J. et al. Specificity of na extracellular proteinase from *Conidiobolus coronatus* and its inhibition by an inhibitor from insect hemolymph. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 62, n. 4, p.186-196, 2006.

BAUER, R. W.; LEMARIÉ, S. L.; ROY A.F. Oral conidiobolomycosis in a dog. **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 2, p. 115-20, 1997.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Presente y futuro del diagnóstico inmunológico de las micosis animales. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. S23-S26, 2000.

BENTO, D. P. et al. Atypical presentation of entomophthoromycosis caused by *Conidiobolus coronatus*. **Medical Mycology**, v. 48, n. 8, p. 1099-1104, 2010.

BITTENCOURT, A.; MARBACK, R.; NOSSA, L. Mucocutaneous entomophthoromycosis acquired by conjunctival inoculation of the fungus. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 5, p. 936-938, 2006.

BOABAID, F. M. et al. Conidiobolomicose em ovinos no Estado de Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 77-81, 2008.

BOGUS, M. I. et al. Effects of insect cuticular fatty acids on *in vitro* growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 4, p. 400-408, 2010.

BOONSARNGSUK, V.; SUANKRATAY, C.; WILDE, H. Presumably entomophthoromycosis in a HIV-infected patient: the first in Thailand. **Journal of Medical Association of Thailand**, v. 84, n. 11, p. 1635-1640, 2001.

BRAS, G. et al. A case of phycomycosis observed in Jamaica; Infection with *Entomophthora coronata*. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 14, p. 141-145, 1965.

BUSAPAKUM, R. et al. Disseminated infection with *Conidiobolus incongruus*. **Sabouraudia**, v. 21, n. 4, p. 323-330, 1983.

CÂMARA, A. C. L. et al. Rhinocerebral and rhinopharyngeal conidiobolomycosis in sheep. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 862-868, 2011.

CARRIGAN, M. J.; SMALL, A. C.; PERRY, G. H. Ovine nasal zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 69, n. 10, p. 237-240, 1992.

CASTELLÁ, G.; HERNÁNDEZ, J. J.; CABAÑES, F. J. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 3-4, p. 291-296, 2005.

CASTRO E SOUZA FILHO, L. G. et al. Rhinofacial entomophthoromycosis due to *Conidiobolus coronatus*. A report of a case treated successfully with fluconazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 5, p. 483-487, 1992.

CHARNLEY, A. K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. **Advances in Botanical Research**, v. 40, p. 241-321, 2003.

CHEN, C. et al. Alginate embedding and subsequent sporulation of in vitro-produced *Conidiobolus thromboides* hyphae using a pressurised air-extrusion. **Biological Control**, v. 69, p. 52-58, 2014.

COSTA, A. R. et al. Rhinofacial zygomycosis caused by *Conidiobolus coronatus*. A case report. **Mycopathologia**, v. 115, p. 1-8, 1991.

COSTA, J. M. L.; BARBOSA, L. N.; PAIVA, L. C. P. Uso de cetoconazol no tratamento da entomoforomicose cutânea-mucosa: relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 3, p. 329-334, 2004.

De PAULA, D. A. J. et al. Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 274-277, 2010.

DUARTE, E. R.; RESENDE, J. C. P.; HAMDAN, J. S. Characterization of typical and atypical *Malassezia* spp. from cattle and dog by random amplified polymorphic dna analysis. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 76, n. 2, p. 157-164, 2009.

EMMONS, C. W.; BRIDGES, C. H. *Entomophthora coronata*, the etiologic agent of a phycomycosis of horses. **Mycologia**, v. 53, p. 307-312, 1961.

FISCHER, N. et al. Rhinofacial *Conidiobolus coronatus* infection presenting with nasal enlargement. **Infection**, v. 36, n. 6, p. 594-596, 2008.

FREIMOSER, F. Est analysis of genes expressed by the zygomycete pathogen *Conidiobolus coronatus* during growth on insect cuticle. **Microbiology**, v. 149, n. 7, p. 1893-1900, 2003.

FRENCH, R. A.; ASHWORTH, C. D. Zygomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a llama (*Lama glama*). **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 1, p. 120-122, 1994.

FURLAN, F. et al. Conidiobolomicose causada por *Conidiobolus lamprauges* em ovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 529-532, 2010.

GANDRA, R. F. et al. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis patients. **Mycopathologia**, v. 162, n. 4, p. 273-280, 2006.

GODOY, I. et al. Expressão diferencial de proteínas do fungo *Conidiobolus lamprauges* cultivado em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 473-478, 2014.

GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Small Practice**, v. 33, n. 4, p. 695-720, 2003.

GRYGANSKYI, A.P. et al. Phylogenetic lineages in entomophthoromycota. **Personia**, v. 30, p. 94-105, 2013.

GUGNANI, H. Entomophthoromycosis due to *Conidiobolus*. **European Journal of Epidemiology**, v. 8, n. 3, p. 391-396, 1992.

HAHN, R. C. et al. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2849-2854, 2003.

HILLIS, D. M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quartely review of biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.

HORTA, J. A. et al. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Medical Mycology**, v. 40, n. 6, p. 565-571, 2002.

HUMBER R.A. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. **Mycotaxon**, v. 120, p. 477-492, 2012.

HUMBER, R. A.; BROWN, C. C.; KORNEGAY, R. W. Equine zygomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 573-76, 1989.

ISA-ISA, R. et al. Rhinofacial conidiobolomycosis (entomophthoramycosis). **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 409-412, 2012.

JAFFEY, P. et al. Disseminated *Conidiobolus* infection with endocarditis in a cocaine abuser. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 114, n. 12, p. 1276-1278, 1990.

JAYAWICKRAMA, M. M. A.; GAMAGE, H. U. P.; PERERA, P. D. *Conidiobolus coronatus* infection of the para-nasal sinuses masquerading as a sino-nasal tumour. **Ceylon Medical Journal**, v. 57, n. 2, p. 87-88, 2012.

JOÃO BATISTA JUNIOR. et al. Simultaneous infection of human host with genetically distinct isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 62-65, 2010.

JOHNSTON, M. J. et al. Ficomicose em muar. Isolamento de *Entomophthora coronata*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 34, p. 51-58, 1967.

KAUFMAN, L.; MENDOZA, L.; STANDARD, P. Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1887-1890, 1990.

KEDRA, E.; BOGUS, M. The influence of *Conidiobolus coronatus* on phagocytic activity of insect hemocytes. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 91, n. 1, p. 50-52, 2006.

KETTERER, P. J. et al. Rhinocerebral and nasal zygomycosis in sheep caused by *Conidiobolus incongruus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 69, n. 4, p. 85-87, 1992.

KIMURA, M. et al. Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprauges*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 752-756, 2011.

KRAUS, P. R. et al. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1249-1260, 2004.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica: Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** São Paulo: Sarvier, p. 1991. cap. 20.

LEOPAIRUT, J. Rhinofacial entomophthoromycosis; A case series and review of the literature. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 41, n. 4, p. 928-935, 2010.

MADSON, D. M. et al. Systemic *Conidiobolus incongruus* infection and hypertrophic osteopathy in a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 1, p. 167-170, 2009.

MACKEY, P. E. et al. Disseminated *Conidiobolus incongruus* in a dog: A case report and literature review. **Medical Mycology Case Reports**, v. 8, p. 24-28, 2015.

MEDWAY, W. Some bacterial and mycotic diseases of marine mammals. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 177, n. 9, p. 831-834, 1980.

MENDONZA, L.; ALFARO, A. A. Equine subcutaneous zygomycosis in Costa Rica. **Mykosen**, v. 28, n. 11, p. 545-549, 1985.

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

MICHAEL, R. C. et al. Unusual presentation of entomophthoromycosis. **Indian Journal of Medicine Microbiology**, v. 27, p. 156-158, 2009.

MIGUITA E SOUZA, J. et al. Rhinofacial zygomycosis: case report. **Einstein**, v. 12, n. 3, p. 347-350, 2014.

MYCOBANK – Fungas databases nomenclature and species banks

Disponível: <<http://pt.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic&Lang=Por>>. Acesso em 15 jan 2015.

MOLL, H. D.; SCHUMACHER, J.; HOOVER, T. R. Entomophthoromycosis conidiobolae in a llama. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 200, n. 7, p. 969-970, 1992.

MORAES, M. A.; ARNAUD, M. V. C.; ALMEIDA, M. M. R. Zigomicose nasofacial no Estado do Pará: registro de dois casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 329-331, 1997.

MORAES, M. A. P. et al. Zigomicose nasofacial. Relato de um caso do Estado do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 2, p. 90-95, 1994.

MORRIS, M. et al. Rhinocerebral zygomycosis in a sheep. **Canadian of Veterinary Journal**, v. 42, n. 3, p. 227-228, 2001.

PEDROSO, R. S. et al. Comparison of primers for RAPD-PCR from environmental isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii* complex. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 951-958, 2012.

PEDROSO, P. M. et al. Rinite micótica rinofaríngea em um ovino texel no Rio grande do sul. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 181-185, 2009.

PEREZ-MARTINEZ, C. et al. Analisis de la variación intraespecífica de *Conidiobolus coronatus* usando RAPD y secuencias ITS. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v. 31, n. 6, p. 357-362, 2013.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 236-301, 2000.

RIET-CORREA, F. et al. Outbreaks of rhinofacial and rhinopharyngeal zygomycosis in sheep in Paraíba, northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 29-35, 2008.

ROSA E SILVA, L. et al. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Research Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 221-229, 2008.

ROY, A. D.; CAMERON, H.M. Rhinophycomycosis entomophthorae occurring in a chimpanzee in the wild in East Africa. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, n. 2, p. 234-237, 1972.

SHARMA, N. L.; MAHAJAN V. K.; SINGH, P. Orofacial conidiobolomycosis due to *Conidiobolus incongruus*. **Mycoses**, v. 46, n. 3-4, p. 137-140, 2003.

SILVA, J. A. G. et al. Genes termorregulados diferencialmente expressos em *Conidiobolus lamprauges*. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1610-1613, 2012.

SILVA, S. M. M. S. et al. Conidiobolomicose em ovinos: reavaliação de três casos pre diagnosticados como tumor etimoidal enzoótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1503-1506, 2010.

SILVA, S. M. M. S. et al. Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no Estado do Piauí. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 184-190, 2007b.

SILVA, S. M. M. S. et al. Conidiobolomycosis in sheep in Brazil. **Veterinary Pathology**, v. 4, n. 3, p. 314-319, 2007a.

SILVEIRA, M. M. et al. Development and application of polymerase chain reaction test for detection of *Conidiobolus lamprauges*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1448-1452, 2013.

SOARES, C. M. A. et al. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplifield polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 505-507, 1995.

STEPHENS, C. P.; GIBSON, J. A. Disseminated zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus* in a deer. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 5, p. 358-359, 1997.

SUBRAMANIAN, C.; SOBEL, J. D. A case of *Conidiobolus coronatus* in the vagina. **Medical Mycology**, n. 49, n. 4, p. 427-429, 2011.

TADANO, T. et al. Entomophthoromycosis (zygomycosis) caused by *Conidiobolus coronatus* in Mato Grosso (Brazil): case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 188-190, 2005.

TONDOLO, J. S. M. et al. *In vitro* susceptibility of *Conidiobolus lamprauges* recovered from sheep to antifungal agents. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 690-693, 2013.

UBIALI, D.G. et al. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, n. 2-3, p. 137-145, 2013.

VALLE, A. C. F. et al. Entomophthoromycosis by *Conidiobolus coronatus*. Report of case successfully treated with the combination of intraconazole and fluconazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 4, p. 233-236, 2001.

VILELA, R. et al. Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 427-432, 2010.

WALKER, S. D. et al. Fatal disseminated *Conidiobolus coronatus* infection in a renal transplant patient. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 98, n. 6, p. 559-564, 1992.

WALSH, T. J. et al. Invasive zygomycosis due to *Conidiobolus incongruus*. **Clinical Infectious Disease**, v. 19, n. 3, p. 423-430, 1994.

WIELOCH, W. et al. Coronatin-1 isolated from entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* kills *Galleria mellonella* hemocytes *in vitro* and forms potassium channels in plantar lipid membrane. **Toxicon**, v. 58, p. 369-379, 2011.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

YANG X. et al. Rhinofacial conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a chinese rice farmer. **Mycoses**, v. 53, n. 4, p. 369-373, 2009.

ZAMOS, D. T.; SCHUMACHER, J.; LOY, J. K. Nasopharyngeal conidiobolomycosis in a horse. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 208, n. 1, p. 100-101, 1996.

APÊNDICE A
(ARTIGOS CIENTÍFICOS)

Proteínas imunorreativas de *Conidiobolus lamprauges* isoladas de ovinos infectados naturalmente¹

Maria C. Silva^{2,3}, Isabela Godoy³, Daniel G. Ubiali⁴, Marcelo M. Silveira³, Letícia C. Pitchenin³, Laila N.S. Brandão³, Valéria Dutra^{3*} e Luciano Nakazato³

ABSTRACT.- Silva M.C., Godoy I., Ubiali D.G., Silveira M.M., Pitchenin L.C., Brandão L.N.S., Dutra V. & Nakazato L. 2015. [Immunoreactive proteins of *Conidiobolus lamprauges* isolated from naturally infected sheep.] Proteínas imunorreativas de *Conidiobolus lamprauges* isoladas de ovinos infectados naturalmente. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(4):344-348. Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa 2673, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78068-900, Brazil. E-mail: valdutra@ufmt.br

The study of sheep conidiobolomycosis has been carried out in its clinical, epidemiological, pathological and molecular aspects. Information, however, about the host immune response in infection *Conidiobolus lamprauges* is absent. This study aimed to identify immunoreactive proteins that may play an important role in the immune response of sheep naturally infected by *C. lamprauges*. For protein and immunological characterization, *C. lamprauges* (strain FIOCRUZ-INCQS 40316) isolated from a sheep with clinical signs of conidiobolomycosis in the MT state and five *sera* samples of naturally infected sheep were used. The presence of IgG antibody was observed in all patients with reagent titers in dilutions up to 1:1600. In immunoblot technique, the antigenic profile against infected sheep *sera* showed twelve reactive bands with molecular weights ranging from 35 to 198 kDa. Among them, the 198 kDa protein was reactive against *sera* from three sheep and the 53 kDa showed increased intensity compared to other bands probably being immunodominant. Healthy animal serum samples showed no reactivity demonstrating the specificity of the technique. The presence of antigenic proteins of *C. lamprauges* and specific IgG in sheep *sera* observed in this study may assist in the development of early diagnostic methods and the use of protein as candidate vaccines for the control and prevention of infection in animals and human.

INDEX TERMS: *Conidiobolus lamprauges*, sheep, immunogenic antigen.

RESUMO.- O estudo de conidiobolomicose ovina tem sido realizado nos seus aspectos clínicos, epidemiológicos, patológicos e moleculares. Informações, entretanto, sobre a resposta imune do hospedeiro na infecção por *Conidiobolus lamprauges* são inexistentes. Este estudo teve por objetivo

a identificação de proteínas imunorreativas que possam desempenhar papel importante na resposta imune de ovinos naturalmente infectados por *C. lamprauges*. Para a caracterização protéica e imunológica foi utilizada a cepa de *C. lamprauges* (FIOCRUZ-INCQS 40316) isolada de ovino com sinais clínicos de conidiobolomicose no Estado do MT e cinco amostras de soro de ovinos infectados naturalmente pelo fungo. A presença de anticorpos IgG foi observada em todos os animais doentes com títulos reagentes em diluições de até 1:1.600. Na técnica do *immunoblot*, o perfil antigênico frente aos soros ovinos com a doença apresentou doze bandas reativas, com massas moleculares variando de 35 a 198 kDa. Dentre estas, a proteína de 198 kDa foi reativa em 3 soros de ovinos e a de 53 kDa apresentou a maior intensidade comparativamente com outras bandas, sendo provavelmente imunodominante. Amostras de soro

¹ Recebido em 3 de setembro de 2014.

Aceito para publicação em 12 de abril de 2015.

² Departamento de Ensino do Curso Técnico em Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Barra do Garças, Estrada de Acesso a BR-158 s/n, Barra do Garças, MT 78600-000, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brasil. *Autor para correspondência: valdutra@ufmt.br

⁴ Setor de Patologia Veterinária, UFMT, Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900.

de animais sadios não apresentaram reatividade demonstrando a especificidade da técnica. A presença de proteínas antigênicas de *C. lamprauges* e IgG específicos em soros de ovinos observados no presente trabalho poderá auxiliar no desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoces e na utilização de proteínas candidatas a vacinas para o controle e prevenção da infecção em animais e humanos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Conidiobolus lamprauges*, ovinos, antígenos imunorreativos.

INTRODUÇÃO

Zigomicoses invasivas são causadas por fungos das ordens Mucorales e Entomophthorales. Dentro dessa última, os fungos saprófitos do gênero *Conidiobolus* (*C.*) têm importância médica e veterinária e estão frequentemente associados com rinite granulomatosa crônica no homem e em várias espécies animais (Humber et al. 1989, Zamos et al. 1996, Bauer et al. 1997, Tadano et al. 2005, Kimura et al. 2011, Isa-Isa et al. 2012), sendo *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruus* e *C. lamprauges* as principais espécies patogênicas (Humber et al. 1989, Carrigan et al. 1992, Ribes et al. 2000, Vilela et al. 2010). A conidiobolomicose vem ganhando importância pela dificuldade no tratamento em função da baixa resposta terapêutica à maioria dos antifúngicos disponíveis (Boabaid et al. 2008, Kimura et al. 2011, Tondolo et al. 2013).

A enfermidade na espécie ovina vem ocorrendo em países de clima tropical e subtropical (Carrigan et al. 1992, Ketterer et al. 1992, Morris et al. 2001, Silva et al. 2007a). No Brasil, casos da doença já foram identificados nos Estados do Piauí, Paraíba, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sendo descritos como um problema sanitário grave acarretando perdas econômicas consideráveis aos produtores de ovinos nessas regiões (Silva et al. 2007a, 2007b, Riet-Correa et al. 2008, Boabaid et al. 2008, Pedrosa et al. 2009, De Paula et al. 2010, Furlan et al. 2010) com taxa de letalidade de 100% (Silva et al. 2007b). Nos Estados do Piauí, Mato Grosso e Santa Catarina a etiologia da doença está associada à infecção por *C. lamprauges* (Silva et al. 2007a, De Paula et al. 2010, Furlan et al. 2010, Vilela et al. 2010).

O diagnóstico da doença tem como princípio os achados epidemiológicos, clínico-patológicos associados ao isolamento do agente em cultivo com a classificação definitiva realizada através de técnicas moleculares como a PCR (Prophet et al. 1992, Ribes et al. 2000, Riet-Correa et al. 2008, Vilela et al. 2010, De Paula et al. 2010, Ubiali et al. 2013, Silveira et al. 2013).

A patogenia da conidiobolomicose não está esclarecida. Genes associados à virulência foram estudados na infecção do fungo em insetos (Freimoser et al. 2003) e a sua capacidade de termo resistência em diferentes temperaturas (Silva et al. 2012, Godoy et al. 2014).

Dados de resposta imunológica do hospedeiro não foram descritos até o momento. Desta maneira, este estudo teve por objetivo a identificação de proteínas imunorreativas que possam desempenhar papel importante na resposta imune de ovinos naturalmente infectados por *C. lamprauges*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa de referência. No presente estudo, foi utilizada a cepa de *Conidiobolus lamprauges* M290/07 (FIOCRUZ-INCQS 40316), isolada de ovino com conidiobolomicose oriundo do município de Nobres/MT, para a caracterização protéica e imunológica. O isolado foi mantido em meio Agar Sabouraud Dextrose (SDA) 2% a 37°C.

Amostras de soro. Cinco amostras de soro (A, B, C, D e E) foram coletadas de ovinos com sinais clínicos e diagnóstico confirmado de conidiobolomicose de quatro diferentes municípios do Estado de Mato Grosso (Quadro 1). A doença foi confirmada por isolamento e PCR. Como controle negativo foram utilizadas duas amostras de ovinos saudáveis (F e G). As amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular em tubos sem anticoagulante, centrifugadas, separadas e os soros estocados a -20°C.

Extração de Proteínas de *Conidiobolus lamprauges*. Para obtenção da proteína, o isolado INCQS 40316 foi cultivado sobre papel filtro em meio SDA e incubado a 37°C durante cinco dias. A extração de proteínas foi realizada segundo adaptações do protocolo descrito por Lakshman et al. (2008). A quantificação das amostras foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (1976).

Ensaio imunoenzimático (ELISA). A técnica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Santurio et al. (2006) com modificações. Placas de poliestireno de 96 cavidades (BD- Biosciences) foram sensibilizadas com 1µg/poço de extrato protéico diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M (pH 9,6) e incubadas em câmara úmida "overnight" a 4°C. Posteriormente, as placas foram submetidas a três lavagens com PBS-T (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄; água destilada qsp 1000ml; pH 7,4; 0,1% Tween 20) seguida de incubação com 100µL tampão PBS-TB (PBS-T acrescido de leite em pó desnatado a 5%) e incubadas a 37°C por uma hora. Após um novo ciclo de três lavagens das placas com PBS-T, as mesmas foram incubadas por uma hora a 37°C com anticorpos primários em diluições seriadas (1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600) PBS-T. Foram realizadas três lavagens com PBS-T seguidas da adição de 100 µL de anticorpos secundários anti-IgG ovino conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:2000 e incubado durante uma hora a 37°C. Em seguida realizaram-se três lavagens com PBS-T, e adicionou-se 100µL do substrato cromógeno 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) por 5 min a temperatura ambiente. A leitura das amostras foi realizada a 595 nm, em duplicatas, no espectrofotômetro Epoch (Biotek).

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Immunoblot. Para a realização da eletroforese, 50 µg de extrato protéico total foi precipitado com solução de ácido tricloroacético (TCA): acetona (1:9), seguido de incubação a -20°C, por 30 min e centrifugação a 12.600g durante 20 min. O precipitado formado foi lavado com 1mL de acetona e ressuspenso em 100µL de tampão de amostra desnaturante 1X (Tris-HCl 0,5M pH 6,8, gli-

Quadro 1. Descrição das amostras de soro ovino utilizados no estudo

Soro	Município	Diagnóstico	Forma clínica	
			Rinofacial	Rinofaríngea
A	Poconé	<i>C. lamprauges</i>	+	
B	Barão Melgaço	<i>C. lamprauges</i>	+	
C	Alto Paraguai	<i>C. lamprauges</i>	+	
D	Nobres	<i>C. lamprauges</i>		+
E	Nobres	<i>C. lamprauges</i>		+
F	Sto A. do Leverger	•	•	•
G	Sto A. do Leverger	•	•	•

• Controle negativo, + Positivo.

cerol 10%, 2-mercaptoetanol 4%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,01%) seguido de homogeneização e incubação a 100°C por 5 minutos. A separação protéica foi realizada em gel de poliacrilamida segundo Laemmli (1970). Os géis foram submetidos à coloração de Coomassie "overnight" e descorados em solução descolorante de acordo com Ausubel et al. (2003).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) (Hybond-P, GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. As membranas foram bloqueadas com PBS-TB e submetidas à lavagem com PBS-T a temperatura ambiente por 1 hora e 5 minutos, respectivamente. A membrana foi incubada com os soros dos diferentes animais (Quadro 1). Após essa etapa, as membranas foram lavadas duas vezes com PBS-T por 10 min, seguida de incubação por 1 hora em anticorpo secundário Anti-IgG de carneiro marcado com peroxidase (Sigma) diluído 1:2000. Após esse período, foram submetidas a três ciclos de lavagens de 10 min com PBS-T. Após a retirada do excesso de PBS-T, foi adicionada à membrana o cromógeno TMB com interrupção da reação com ácido sulfúrico 1M. Todas as lavagens e incubações foram realizadas a temperatura ambiente e todas as capturas de imagens realizadas no sistema ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) com auxílio do software Image Lab™ (Bio-Rad).

RESULTADOS

Na quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976) o rendimento do extrato obtido foi de 7µg/µL. A análise de 50µg do extrato protéico de *Conidiobolus lamprauges* por SDS-PAGE corado com Coomassie permitiu evidenciar presença de bandas com massas moleculares variando de 6 a 198 kDa (Fig.1).

Em relação à presença de anticorpos específicos, todas as amostras de soros de animais doentes foram reativas. Os títulos de anticorpos para proteínas de *C. lamprauges* foram observados em diluições variando de 1:100 a 1:1.600 (Fig.2). Para estabelecer o ponto de corte da reação foi considerada a média dos valores de leitura de densidade ótica

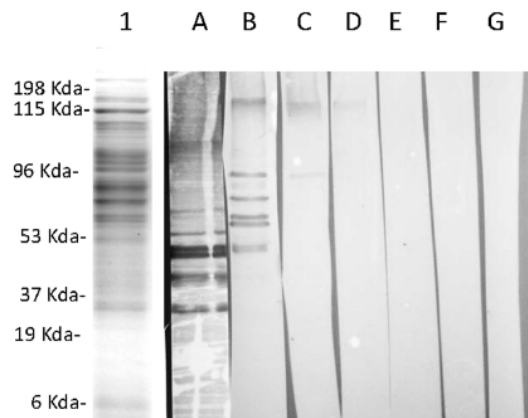


Fig.1. Perfil protéico de *Conidiobolus lamprauges* (INCQS 40316) de micélio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) e imunoblot com soro de ovinos doentes por *C. lamprauges*. (1) Extrato protéico de *C. lamprauges* (INCQS 40316); (A-E) Soro de ovinos naturalmente infectados; (F,G) Soro de ovinos saudáveis.

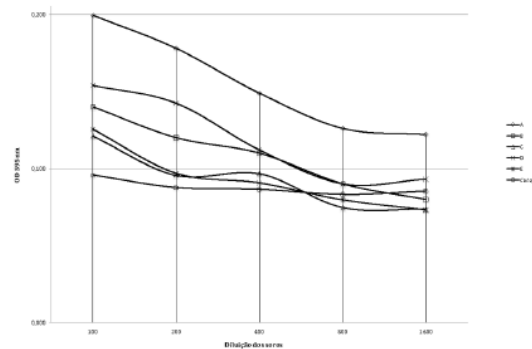


Fig.2. Títulos médios de duplicatas das amostras de soro de ovinos naturalmente infectados com *Conidiobolus lamprauges* (A-E) e saudáveis (F,G) por ELISA.

(OD) das amostras negativas acrescidas de duas vezes o desvio padrão (Fig.2). Os soros apresentaram positividade até diluições de 1:400. Somente a amostra do animal A, entretanto, apresentou títulos altos com positividade em diluições de 1:800 e 1:1600 (Fig.2).

Durante a realização do *Immunoblot*, o perfil antigênico resultante da reação do extrato protéico de *C. lamprauges* frente aos soros de ovinos com a enfermidade apresentou doze bandas reativas. As massas moleculares destas foram 198, 115, 96, 90, 80, 75, 70, 65, 60, 53, 50 e 35 kDa em quatro amostras de soros (A, B, C e D). Algumas bandas foram reativas apenas para um dos soros testados (bandas de 115, 75, 60, 50 e 35 kDa na amostra A, e as de 90, 80, 70 e 65 kDa na amostra B). Duas proteínas reagiram de maneira similar para dois soros (96kDa para os soros B e C e 53 kDa para os soros A e B). A proteína de 198 kDa reagiu com três soros (B, C e D). O soro E não reagiu com nenhuma das proteínas. Da mesma forma, os soros utilizados como controle negativos (F e G) não apresentaram reatividade frente às proteínas extraídas de *C. lamprauges* (Fig.1).

DISCUSSÃO

A análise do perfil protéico do extrato miceliano submetido à separação por SDS-PAGE permitiu visualizar o padrão de bandas do isolado de *Conidiobolus lamprauges* sendo evidenciadas bandas em toda extensão do gel, com massas moleculares variando de 6 a 198 kDa. A diversidade de bandas observadas neste estudo difere do observado em estudo prévio realizado por Mendonza et al. (1992) utilizando outra espécie, *C. coronatus*, onde os mesmos evidenciaram pela coloração de prata 16 bandas, nove de alto peso molecular (97 a 31 kDa) e sete com massa molecular inferior a 31kDa. A diferença no número de bandas observadas neste estudo pode estar relacionada a diferenças entre as espécies utilizadas, as condições de cultivo do fungo e do preparo dos antígenos (Camargo & Franco 2000).

No teste de ELISA foi possível detectar anticorpos anti-extratos protéicos de *C. lamprauges*. Os níveis de detecção de anticorpos variaram conforme o soro testado. A maior reatividade da amostra A e a diferença nos títulos obser-

vados podem estar relacionadas à resposta dos animais frente à infecção por *C. lamprauges*. Em algumas infecções fúngicas, como a cromoblastomicose humana, os títulos de anticorpos variam muito entre pacientes doentes (Esterre et al. 2000) e, em casos de outros fungos como *Coccidioides immitis* em equinos, os títulos mais altos estão associados a quadros clínicos com prognósticos desfavoráveis, geralmente associados à pneumonia e infecções generalizadas (Higgins et al. 2007).

O ELISA vem sendo utilizado na detecção de anticorpos específicos nos casos de pitiose, mostrando alto grau de sensibilidade e especificidade, possibilitando a detecção de infecções na fase inicial da doença (Mendoza et al. 1997, Santurio et al. 2006). Mendoza et al. (1992) em trabalho conduzido com amostras de cinco soros obtidos de equinos com pitiose identificaram um antígeno de 44kDa, que reagiu de forma cruzada com antígeno de *C. coronatus*, não sendo esclarecida a relação antigênica entre as espécies. Em nosso estudo a utilização do extrato protéico de cultivo não apresentou reatividade com amostras de ovinos com pitiose, sendo possível a utilização desta técnica de forma específica para o diagnóstico de ovinos com conidiobolomicose.

Os anticorpos presentes nos soros detectaram doze proteínas antigênicas para *C. lamprauges* com massas moleculares estimadas de 198, 115, 96, 90, 80, 75, 70, 65, 60, 53, 50 e 35 kDa. Em uma amostra não se verificou reconhecimento de proteínas antigênicas para caracterização imunológica, porém, foram observadas variações no número e na intensidade de bandas em quatro soros reagentes. Houve diferença no padrão de reconhecimento entre os casos rinofaciais e rinofaríngeos da doença. A variação na resposta imune humoral observada pode estar relacionada à virulência da cepa, à fase de infecção e à cronicidade da doença para o desencadeamento de uma resposta imune do hospedeiro (Krajaejun et al. 2006, Zapata et al. 2012).

Dentre as proteínas observadas no estudo, as de massas moleculares 53 e 198 kDa parecem ser imunodominantes, destacando-se das demais, pela maior intensidade da reação. Portanto, a identificação e caracterização das mesmas podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade nos casos da conidiobolomicose ovina, bem como na utilização para diagnósticos sorológicos ou como candidatos a vacinas. Estudos conduzidos em fungos patogênicos de importância biomédica já permitiram obter importantes informações sobre proteínas imunogênicas com papel fundamental no processo de invasão, sobrevivência no hospedeiro e como possíveis candidatos a vacina (Camargo et al. 1989, Krajaejun et al. 2006, Chindamporn et al. 2009, Perenha-Viana et al. 2012, Magalhães et al. 2012).

CONCLUSÃO

A presença das proteínas antigênicas observadas no presente trabalho poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos patogênicos e no papel na imunidade do hospedeiro, além de contribuir para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoces e estabelecimento de tratamentos clínicos e vacinas pela importância crescente de *Conidiobolus lamprauges* na medicina veterinária e humana.

Agradecimentos. - À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (Fapemat) e a CAPES pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. & Stuhl K. 2003. Current Protocols in Molecular biology. Copyright John Wiley and Sons. New York, NY. 4410p.
- Bauer R.W., Lemarie S.L. & Roy A.F. 1997. Oral conidiomycosis in a dog. Vet. Dermatol. 8(2):115-120.
- Boabaid F.M., Ferreira E.V., Arruda L.P., Gasparetto N.D., Souza R.L., Silva M.C., Dutra V., Nakazato L. & Colodel E.M. 2008. Conidiobolomicose em ovinos no Estado de Mato Grosso. Pesq. Vet. Bras. 28(1):77-81.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Camargo Z.P. & Franco M.F. 2000. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Revta Iberoam. Micol. 17:41-48.
- Camargo Z.P., Unterkircher C. & Travassos L.R. 1989. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. J. Med. Vet. Mycol. 27:407-412.
- Carrigan M.J., Small A.C. & Perry G.H. 1992. Ovine nasal zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus*. Aust. Vet. J. 69(10):237-240.
- Chindamporn A., Vilela R., Hoag K.A. & Mendoza L. 2009. Antibodies in the sera of host species with pythiosis recognize a variety of unique immunogens in geographically divergent *Pythium insidiosum* strains. Clin. Vaccine Immunol. 16(3):330-336.
- De Paula D.A., Oliveira Filho J.X., Silva M.C., Colodel E.M., Broetto L., Pinto P.M., Schrank A., Nakazato L. & Dutra V. 2010. Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil. J. Vet. Diagn. Invest. 22:274-277.
- Esterre P., Jahevitra M. & Andriantsimahavandy A. 2000. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7(3):497-500.
- Freimoser F., Screen S., Hu G. & Leger R. 2003. EST analysis of genes expressed by the zygomycete pathogen *Conidiobolus coronatus* during growth on insect cuticle. Microbiology 149(7):1893-1900.
- Furlan H.F., Luciolli J., Veronezi L.O., Fontequê J.H., Traverso S.D., Nakazato L. & Gava A. 2010. Conidiobolomicose causada por *Conidiobolus lamprauges* em ovinos no Estado de Santa Catarina. Pesq. Vet. Bras. 30(7):529-532.
- Godoy I., De Paula D.A.J., Silveira M.M., Brandão L.N.S., Dutra V. & Nakazato L. 2014. Expressão diferencial de proteínas do fungo *Conidiobolus lamprauges* cultivado em diferentes temperaturas. Ciência Rural 44(3):473-478.
- Higgins J.C., Pusterla N. & Pappagianis D. 2007. Comparison of *Coccidioides immitis* serological antibody titres between forms of clinical coccidioidomycosis in horses. Vet. J. 173:118-123.
- Humber R.A., Brown C.C. & Kornegay R.W. 1989. Equine zygomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges*. J. Clin. Microbiol. 27(3):573-576.
- Isa-Isa R., Arenas R., Fernandez R.F. & Isa M. 2012. Rhinofacial conidiobolomycosis (entomophthoromycosis). Clin. Dermatol. 30:409-412.
- Ketterer P.J., Kelly M.A., Connole M.D. & Ajello L. 1992. Rhinocerebral and nasal zygomycosis in sheep caused by *Conidiobolus incongruus*. Aust. Vet. J. 69(4):85-87.
- Kimura M., Yaguchi T., Sutton D.A., Fortherrgill A.W., Thompson E.H. & Wickes B.L. 2011. Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprauges*. J. Clin. Microbiol. 49:752-756.
- Krajaejun T., Kunakorn M., Prachartam R., Chongtrakool P., Sathapatayavongs B., Chaiprasert A., Vanittanakom N., Chindamporn A. & Mootsikapun P. 2006. Identification of a novel 74-kiloDalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. J. Clin. Microbiol. 44(5):1674-1680.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 227(259):680-685.

- Lakshman D.K., Natarajan S.S., Lakshman S., Garrett W.M. & Dhar A.K. 2008. Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani*. *Mycologia* 100(6):867-875.
- Magalhães A., Ferreira K.S., Almeida S.R., Nosanchuk J.D., Travassos L.R. & Taborda C.P. 2012. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 19(1):23-29.
- Mendoza L., Kaufman L. & Mandy W.G.R. 1997. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 4(6):715-718.
- Mendoza L., Nicholson V. & Prescott J.F. 1992. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. *J. Clin. Microbiol.* 30(11):2980-2983.
- Morris M., Ngeleka M., Adogwa A.O., Lalla G., St-Germain G. & Higgins R. 2001. Rhinocerebral zygomycosis in a sheep. *Can. Vet. J.* 42:227-228.
- Pedroso P., Raymundo D., Bezerra J., Oliveira E., Sonne L., Dalto A. & Driemeier D. 2009. Rinite micótica rinofaríngea em um ovino Texel no Rio Grande do Sul. *Acta Scient. Vet.* 37:181-185.
- Perenha-Viana M.C.Z., Gonzales I.A.A., Brockelt S.R., Machado L.N.C. & Svidzinski T.I.E. 2012. Serological diagnosis of Paracoccidioidomycosis through a Western blot technique. *Clin. Vaccine Immunol.* 19(4):616-619.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington. 279p.
- Ribes J., Vanover-Sams C.L. & Baker D.J. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:236-301.
- Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Azevedo E.O., Simões S.D.V., Silva S.M.M.S., Vilela R. & Mendoza L. 2008. Outbreaks of rhinofacial and rhinopharyngeal zygomycosis in sheep in Paraíba, northeastern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 28(1):29-35.
- Santurio J.M., Leal A.T., Leal A.B.M., Alves S.H., Lubeck I., Griebeler J. & Copetti M.V. 2006. Teste de Elisa indireto para diagnóstico sorológico de pitiose. *Pesq. Vet. Bras.* 26:47-50.
- Silva J.A.G., De Paula D.A.J., Silveira M.M., Silva M.C., Brandao L.N.S., Pitchenin L.C., Nakazato L. & Dutra V. 2012. Genes termorregulados diferencialmente expressos em *Conidiobolus lamprauges*. *Ciência Rural* 42(9):1610-1613.
- Silva S.M.M.S., Castro R.S., Costa F.A.L., Vasconcelos A.C., Batista M.C.S., Riet-Correa F. & Carvalho E.M.S. 2007a. Conidiobolomycosis in sheep in Brazil. *Vet. Pathol.* 44:314-319.
- Silva S.M.M.S., Castro R.S., Costa F.A.L., Vasconcelos A.C., Batista M.C.S., Riet-Correa F., Carvalho E.M.S. & Lopes J.B. 2007b. Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomycose em ovinos no Estado do Piauí. *Pesq. Vet. Bras.* 27(4):184-190.
- Silveira M.M., De Paula D.A.J., Silva M.C., Pitchenin L.C., Cruz R.A.S., Colodel E.M., Dutra V. & Nakazato L. 2013. Development and application of polymerase chain reaction test for detection of *Conidiobolus lamprauges*. *Pesq. Vet. Bras.* 33(12):1448-1452.
- Tadano T., Paim N.P., Hueb M. & Fontes C.J.F. 2005. Entomoftromicose (zigomicose) causada por *Conidiobolus coronatus* in Mato Grosso (Brasil): relato de caso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (2):188-190.
- Tondolo J.S.M., Loreto E.S., Dutra V., Nakazato L., De Paula D.A.J., Zanette R.A., Alves S.H. & Santurio J.M. 2013. In vitro susceptibility of *Conidiobolus lamprauges* recovered from sheep to antifungal agents. *Vet. Microbiol.* 166 (3/4):690-693.
- Ubiali D.G., Cruz R.A.S., De Paula D.A.J., Silva M.C., Mendonça F.S., Dutra V., Nakazato L., Colodel E.M. & Pescador C.A. 2013. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. *J. Comp. Pathol.* 149(2/3):137-145.
- Vilela R., Silva S.M.S., Riet-Correa F., Domínguez E. & Mendonza L. 2010. Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep. *J. Clin. Microbiol.* 48(2):427-432.
- Zamos D.T., Shumacher J. & Loy J.K. 1996. Nasopharyngeal conidiobolomycosis in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208(1):100-101.
- Zapata F., Perazzo Y., Ortega I., Torres A. & Lopez J.A. 2012. Caracterización de proteínas inmunodominantes de *Pythium insidiosum* y su uso en inmunoensayos para la detección de pitiosis en perro (*Canis lupus familiaris*). *Gac. Cienc. Vet.* 17(1):25-30.

07-Jul-2015

Dear Ms. Silva:

A manuscript titled Genetic variability of *Conidiobolus lamprauges* fungi isolates from sheep by RAPD (CMB-15-07-0634) has been submitted by Dr. LUCIANO NAKAZATO to the Current Microbiology.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/cm>

USER ID: maria.cristina@bag.ifmt.edu.br

PASSWORD:

To enter your account, please do the following:

1. Go to: <https://mc.manuscriptcentral.com/cm>
2. Log in using this information:

:

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. This password is case-sensitive and temporary. Please log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/cm> to update your account information and change your password.

Thank you for your participation.

Sincerely,
Current Microbiology Editorial Office

Genetic variability of *Conidiobolus lamprauges* fungi isolates from sheep by RAPD

Maria C.Silva¹, Isabela Godoy¹, Francielle C. Kagueyama¹, Francisco A. L. Souza¹, Silvana M. M. S. Silva², Luciano Nakazato¹, Valéria Dutra^{1*}

¹ Laboratório de Microbiologia Veterinária, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa 2673, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78068-900, Brazil.

*e-mail: valdutra@ufmt.br, tel: +55 6536158625, ² Setor de Patologia Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Av. Universitária s/n, Ininga, Teresina, PI 64049-550, Brazil.

ABSTRACT

Conidiobolomycosis in sheep has been reported in tropical and subtropical climates with high humidity and is associated with high lethality and economic losses. In Brazil, outbreaks of this disease have been described in the Northeast, Midwest and South regions, mainly in ovine with two clinical forms: rhinopharyngeal and rhinofacial. In addition to occurring in regions of Brazil in different clinical forms, no data about the genetic diversity of *Conidiobolus lamprauges* is available. Thus, the aim of this study was to evaluate seven isolates of *C. lamprauges* from ovine clinical cases of conidiobolomycosis using five primers with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Amplicons were observed in all isolates and ranged from 200 to 2,500 bp, with primer p50 leading to the most polymorphic amplicons. Phylongenetic analysis detected four groups (A, B, C and D) with 36% similarity between isolates. MatoGrosso isolates were in groups A and B, and the rhinofacial form was present only in group B. Genetic variability in Brazilian isolates of *Conidiobolus lamprauges* is likely related both to the clinical form of the disease and the geographic location.

INDEX TERMS: *Conidiobolus* sp., RAPD, sheep, zygomycosis.

INTRODUCTION

Conidiobolus (*C.*) *coronatus*, *C. incongruus* and *C. lamprauges* fungi, the Entomophthorales order, have been described as the principal agents of conidiobolomycosis. This disease is characterized by granulomatous mycosis and is important in human and veterinary medicine due to its disabling potential and high lethality in the affected species, which can cause serious socio-economic (Humber et al. 1989, Zamos et al. 1996, Bauer et al. 1997, Ribes et al. 2000, Tadano et al. 2005, Vilela et al. 2010, Kimura et al. 2011, Isa-Isa et al. 2012, Bachelet et al 2014). In sheep, the disease

has been reported in tropical and subtropical climates with high humidity, (Carrigan et al. 1992, Ketterer et al. 1992, Morris et al. 2001, Silva et al. 2007a) and it progresses with granulomatous rhinitis that can occur in two clinical forms: rhinopharyngeal and rhinofacial infection (Ketterer et al 1992, Morris et al. 2001, Boabaid et al. 2008, Riet-Correa et al. 2008, Silva et al. 2007a, Câmara et al 2011).

In Brazil, sheep conidiobolomycosis outbreaks have been described in the Northeast, Midwest and South regions (Silva et al. 2007a, Silva et al. 2007b, Boabaid et al. 2008, Riet-Correa et al. 2008, Pedroso et al. 2009, De Paula et al. 2010, Furlan et al. 2010). In the state of Mato Grosso, outbreaks were associated with *C. lamprauges*, (De Paula et al. 2010, Ubiali et al. 2013, Silveira et al. 2013), as was also observed in Piauí and Santa Catarina (Silva et al 2007a, Vilela et al. 2010, Furlan et al 2010, Vilela et al. 2010).

Studies concerning diagnostic techniques, the epidemiology and the biology of the disease are available (De Paula et al. 2010, Silveira et al. 2013, Godoy et al. 2014); however, information on the genetic variability of the species is still lacking. This study evaluated isolates of *C. lamprauges* from clinical cases of conidiobolomycosis in sheep using random amplified polymorphic DNA RAPD.

MATERIAL AND METHODS

Isolates

Seven isolates of *C. lamprauges* from sheep clinical cases of conidiobolomycosis in different regions of Brazil were used in this study. The epidemiological and clinical isolates are reported in Table 1. Confirmation of the isolates identified as *C. lamprauges* was performed by PCR according to the protocol proposed by Silveira et al. (2013).

Extraction of genomic DNA

For DNA extraction, we used the protocol described by Fulton et al. (1995) with modifications. The isolates were grown for three days on filter paper through 2% Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and incubated at 37 ° C. The collected mycelium (0.5 g) was macerated in liquid nitrogen and rapidly transferred to tubes previously filled with 17.7 mL of lysis buffer (Buffer A: 100 mM Tris-HCl pH 9.0; 5.0 mM EDTA pH 8.0 + Buffer B: 200 mM Tris-HCl pH 9.0; 50 mM EDTA pH 8.0; 2.0 M NaCl; 2% CTAB pre heated to 65 ° C), homogenized and incubated for 60 min at 65 ° C under constant agitation. Then, 5.75 mL of potassium acetate (5 M) was added and the samples were incubated on ice for 30 min and centrifuged (5,000 X g for 20 min at 4 ° C). Chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) was added to the

aqueous phase and the sample was centrifuged at 4,000 g at 4 ° C for 10 min. The transferred supernatant was treated with RNase A (50 mcg / mL, Sigma ®) for 60 min at 37 ° C. Then, the DNA was precipitated with sodium acetate and isopropanol (0.1: 1) for 5 min, centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4 ° C and washed with 2 mL of 70% ethanol (v / v). The precipitate was washed again with 70% ethanol, centrifuged at 1,000 g for 5 minutes at 4 ° C and dried at room temperature. The precipitate was then resuspend in 1 mL ultra pure water with 5µl RNase A (50 µg /mL, Sigma ®) and was maintained at -20 ° C overnight. Subsequently, 120 µL of DNA was added with 80 µL of TE (10 mMTris-HCl pH 8.0, 1.0 mM EDTA, pH 7.0) and was purified using an Ultra Clean TM BloodSpin Kit (Mo Bio Laboratories) according to manufacturer's instructions. The DNA integrity was assessed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with Red TM gel (Biotium®) and observed by ChemiDoc XRS TM (Bio-Rad) using ImageLab TM software (Bio-Rad). Quantification of DNA was carried out by Qubit 2.0 system (Invitrogen) according to manufacturer's instruction.

PCR-RAPD

For the amplification of genomic DNA by the RAPD technique, we used the method described by Castellá et al. (2005) with modifications; wherein, each isolate was tested with five oligonucleotides, M13, OPB7, P22, P50 and P-51 as described in Table 3. The reactions were performed in a final volume of 25 µL [100 ng DNA 0.2 mMdNTPs, 10 pmol primer, 3.5 mM MgCl₂, and 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 1X PCR buffer (200 mMTris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl)]. The reaction consisted of an initial denaturation at 95 ° C for 3 minutes followed by 30 cycles of denaturation at 95 ° C for 30 seconds, annealing at 44 ° C for 1 minute, and extension at 72 ° C for 1 minute and 10 seconds, with a final extension at 72 ° C for 7 minutes. The amplified products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis at 10 V for 4 hours, stained with Red TM (Biotium®), followed by capture of images in ChemiDocTm + XRS system (Bio-Rad) with software Image LabTm aid (bio-Rad). The molecular weight marker used was Ladder 100pb (GeneRuler 100pb DNA Ladder, Thermo Scientific). *Cryptococcus gatii* WM179 (VGI- serotype B) was used as a control sample reference.

The interpretation of the results of the RAPD analysis was based on the presence or absence of amplicons resulting from amplification with the five selected primers. The genetic diversity of strains was calculated based on the DICE coefficient, and dendrograms were obtained by the UPGMA method using BioNumerics software (version 7.10).

RESULTS

The analysis of amplification profiles using the five initiators allowed evaluation of the genetic diversity of the seven isolates of *C. lamprauges*. Amplicons were observed from all isolates and ranged from 200 to 2,500 bp (Figure 1). A total of 381 bands produced by 5 primers were observed (Table 3), primer P50 was more effective with 93 bands, and primer OPB7 was less effective with 58 bands (table 2). Of the total amplicons, 72 were absent in at least one of the isolates analyzed, and these were referred to as polymorphic (Table 3). The primer P50 had the highest number of polymorphic amplicons, while OPB7 and P51 had the lowest number.

The genetic similarity between the isolates was 36%, and the dendrogram constructed from the analysis of band patterns obtained with the five primers allowed for differentiation of seven isolates into four groups (A, B, C and D) (Figure 2).

Group A includes isolates 40315, 40316 and 40317 (87% similarity), all from the MT State (Figure 2). Group B, with two isolates (40319 and 40320, 87.3% similarity), also from the MT state, originated from animals affected only with the rhinofacial form of conidiobolomycosis. In group C, the isolate 40318 originating in Brasilia and D, the isolate M903/13, originated from Piauí, and both animals were affected with the rhinopharyngeal form (Figure 2).

DISCUSSION

In this study, it was possible to evaluate the genetic diversity of *C. lamprauges* isolates from three different Brazilian geographic areas using five different primers. Perez-Martinez et al. (2013), seeking to evaluate the genetic diversity of 11 isolates of *C. coronatus* with 13 oligonucleotides, found 48 polymorphic fragments with genetic variation between the isolates. These were grouped according to their origin: insect, organic compost, soil and human. Other studies assessed the intra and interspecies genetic variability of various organisms including fungi such as *Paracoccidioides* (Soares et al. 1995, Batista Junior et al. 2010), *Malassezia*, (Castella et al. 2005, Gandra et al. 2006, Duarte et al. 2009) and *Cryptococcus* (Andrade-Silva et al. 2012, Pedroso et al. 2012).

C. lamprauges isolates were separated into groups based on their geographical origin and isolates from MatoGrosso (group A and B) differed from other regions (C and D), reflecting diversity between each region. Similar results were observed from *Paracoccidioides brasiliensis* (Hahn et al. 2003) and *Cryptococcus neoformans/gattii* complexes that are distributed worldwide; however, the genotype VG IV (*C. tetragattii*) was described mainly in Africa (Chen et al. 2014, Hagen et al. 2015).

Rhinopharyngeal conidiobolomycosis is more common and severe (Ubiali et al. 2013) compared to rhinofacial cases (group B). This difference could be associated with different genetic groups as described in *Blastomyces dermatitidis* (Meece et al. 2013), where humans infected with group 1 strains were more likely to have respiratory-only disease. Patients infected with group 2 strains were more likely to have disseminated disease. *Paracoccidioides brasiliensis/lutzii* complex (Hahn et al. 2003) and *Cryptococcus neoformans/gattii* complex shows genetic diversity in populations associated with specific genotypes (Chen et al. 2014, Hagen et al. 2015).

These results suggest that genetic variability is likely related to both the clinical form of the disease and geographic location of the isolates.

Acknowledgments

The Foundation of the State of Mato Grosso (FAPEMAT).

REFERENCES

1. Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, da Silva PR, Andrade AA, Lages-Silva E, Pedrosa AL & Silva-Vergara ML. 2012. RAPD analysis the primer L15996 of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates. Mycopathologia. 174(1): 53-59.
2. Bachelet JT, Buiret G, Chevallier M, Bergerot JF, Ory L & Gleizal A. 2014. Infection a *Conidiobolus coronatus* revelee par une tumeur de la face. Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale. 115: 114-117.
3. Batista Junior J, Berzaghi R, Monte Arnaud ADM, Fontes CJF, Camargo ZP & Hahn RC. 2010. Simultaneous infection of human host with genetically distinct isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105(1): 62-65.
4. Bauer RW, Lemarie SL & Roy AF. 1997. Oral conidiolomycosis in a dog. Vet Dermatol. 8(2): 115-120.
5. Boabaid FM, Ferreira EV, Arruda LP, Gasparetto ND, Souza RL, Silva MC, Dutra V, Nakazato L & Colodel EM. 2008. Conidiobolomycose em ovinos no Estado de Mato Grosso. Pesq Vet Bras. 28:77-81.
6. Câmara ACL, Soto-Blanco B, Batista JS, Vale AM, Feijó FMC, Olinda RG. Rhinocerebral and rhinopharyngeal conidiobolomycosis in sheep. Ciência Rural 2011; 41: 862-868.
7. Carrigan M, Small A & Perry G. 1992. Ovine nasal zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus*. Aust Vet. 69: 237-240.
8. Castellá G, Hernandez JJ & Cabanes FJ. 2005. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. Vet Microbiol. 128: 291-296.
9. Chen SC, Meyer W & Sorrell TC. 2014. *Cryptococcus gatti* infections. Clin Microbiol Rev. 27(4): 980-1024.

10. De Paula DAJ, Oliveira Filho JX, Silva MC, Colodel EM, Broetto L, Pinto PM, Schrank A, Nakazato L & Dutra V. 2010. Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil. *J Vet Diagn Invest.* 22: 274-277.
11. Duarte ER, Resende JCP & Hamdan JS. 2009. Characterization of typical and atypical *Malassezia* spp. from cattle and dog by random amplified polymorphic dna analysis. *Arq Inst Biol.* 76(2): 157-164.
12. Fulton TM, Chunwongse J & Tanksley SD. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Pl Mol Biol Rep.* 13(3): 207-209.
13. Furlan HF, Luciola J, Veronezi LO, Fontequê JH, Traverso SD, Nakazato L & Gava A. 2010. Conidiobolomycose causada por *Conidiobolus lamprauges* em ovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesq Vet Bras.* 30(7): 529-532.
14. Gandra RF, Simão RCG, Matsumoto FE, Silva BCM, Ruiz LS, da Silva EG, Gambale W & Paula CR. 2006. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients. *Mycopathologia.* 162: 273-280.
15. Godoy I, De Paula DAJ, Silveira MM, Brandão LNS, Dutra V & Nakazato L. 2014. Expressão diferencial de proteínas do fungo *Conidiobolus lamprauges* cultivado em diferentes temperaturas. *Ciência Rural.* 44(3): 473-478.
16. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolečka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Parnmen S, Lumbsch HT & Boechout T. 2015. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet.* 78: 16-48.
17. Hahn RC, Macedo AM, Fontes CJF, Batista RD, Santos NL & Hamdan JS. 2003. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 41: 2849-2854.
18. Humber RA, Brown CC & Kornegay RW. 1989. Equine zygomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges*. *J Clin Microbiol.* 27(3): 573-576.
19. Isa-Isa R, Arena R, Fernandez RF & Isa M. 2012. Rhinofacial conidiobolomycosis (entomophthoromycosis). *Clin Dermat.* 30: 409-412.
20. Ketterer P, Kelly M, Connole M & Ajello L. 1992. Rhinocerebral and nasal zygomycosis in sheep caused by *Conidiobolus incongruus*. *Aust Vet J.* 69: 85-87.
21. Kimura M, Yaquchi T, Sutton DA, Fothergill AW, Thompson EH & Wickes BL. 2011. Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprauges*. *J Clin Microbiol.* 49: 752-756.
22. Meece JK, Anderson JL, Gruska S, Sloss BL, Sullivan B & Reed KD. 2013. Variation in clinical phenotype of human infection among genetic groups of *Blastomyces dermatitidis*. *J Infect Dis.* 207(5): 814-822.
23. Morris M, Ngeleka M, Adogwa AO, Lalla G, St-Germain G & Higgins R. 2001. Rhinocerebral zygomycosis in a sheep. *Can Vet J.* 42: 227-228.
24. Pedroso P, Raymundo D, Bezerra J, Oliveira E, Sonne L, Dalto A & Driemeier. 2009. Rinite micótica rinofaríngea em um ovino Texel no Rio Grande do Sul. *Acta Scient Vet.* 37: 181-185.
25. Pedroso RS, Ferreira JC, Costa KRC & Candido RC. 2012. Comparison of primers for RAPD-PCR from environmental isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii* complex. *Braz J. Microbiol.* 951-958.

26. Perez-Martinez C, Rojas-Martinez RI, Alatorre-Rosas R, Hernandez-Rosas F & Otero-Colina, G. 2013. Analisis de La variación intraespecífica de *Conidiobolus coronatus* usando RAPD y secuencias ITS. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 31(6): 357-362.
27. Ribes J, Vanover-Sams C & Baker D. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev*. 13: 236-301.
28. Riet-Correa F, Dantas AFM, Azevedo EO, Simões SDV, Silva SMMS, Vilela R & Mendoza L. 2008. Outbreaks of rhinofacial and rhinopharyngeal zygomycosis in sheep in Paraíba, northeastern Brazil. *Pesq Vet Bras*. 28: 29-35.
29. Silva SMMS, Castro RS, Costa FAL, Vasconcelos AC, Batista MCS, Riet-Correa F & Carvalho EMS. 2007a. Conidiobolomycosis in sheep in Brazil. *Vet Pathol*. 44: 314-319.
30. Silva SMMS, Castro RS, Costa FAL, Vasconcelos AC, Batista MCS, Riet-Correa F, Carvalho SEM & Lopes JB. 2007b. Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no Estado do Piauí. *Pesq Vet Bras*. 27(4): 184-190.
31. Silveira MM, De Paula DAJ, Silva MC, Pitchenin LC, Cruz RAS, Colodel EM, Dutra V & Nakazato L. 2013. Development and application of polymerase chain reaction test for detection of *Conidiobolus lamprauges*. *Pesq Vet Bras*. 33(12): 1448-1452.
32. Soares CMA, Mollinari-Madlun EEWI, da Silva SP, Pereira M & Felipe MSS. 1995. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplifield polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*. 33(2): 505-507.
33. Tadano T, Paim N, Hueb M & Fontes C. 2005. Entomophthoromycosis (zygomycosis) caused by *Conidiobolus coronatus* in Mato Grosso, Brazil: case report. *Revta Soc Bras Med Trop*. 38: 188-190.
34. Ubiali DG, Cruz RAS, De Paula DAJ, Silva MC, Mendonca FS, Dutra V, Nakazato L, Colodel EM & Pescador CA. 2013. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. *J Comp Path*. 149(2-3): 137-145.
35. Vilela R, Silva SMS, Riet-Correa F, Dominguez E & Mendoza L. 2010. Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep. *J Clin Microbiol*. 48(2): 427-432.
36. Zamos DT, Shumacher J & Loy JK. 1996. Nasopharyngeal conidiobolomycosis in a horse. *J Am Vet Med Assoc*. 208(1): 100-101

Table 1. Epidemiological and clinical characteristics of *C. lamprauges* isolates.

Sample	INCQS	Month/Age	Origin	Age	Sex	Race	Clinical form	
							Rhinofacial	Rhinopharyngeal
M290/07	40316	06/2007	Nobres/MT	6 month	Female	Santa Inês		+
M303/07	40317	06/2007	Nobres/MT	6 month	Female	Santa Inês		+
M260/09	40315	05/2009	Poconé/MT	NI	NI	NI		+
M614/09	40319	10/2009	Poconé/MT	3 age	Female	Santa Inês	+	
M446/10	40318	05/2010	Brasília/DF	Adult	Female	NI		+
M624/11	40320	04/2011	Barão de Melgaço/MT	3 age	Male	Bergamascia	+	
M903/13	ND	09/2013	Teresina/Piauí	2 age	Female	Santa Inês		+

NI = Unknown; ND= Not deposited in INCQ

Table 2 Number of amplicons obtained with five primers and the group classification of clinical isolates of *C. lamprauges* by RAPD.

Sample	Group	Number of amplicons				
		M13	OPB7	P22	P50	P51
40316	A	15	8	14	15	12
40317	A	16	8	13	17	9
40315	A	12	8	12	12	11
40319	B	10	7	12	13	7
40318	C	8	10	12	11	4
40320	B	10	8	12	12	11
903/13	D	8	9	14	13	8
Total		79	58	89	93	62

Table 3. Sequences of primers used and the number of amplicons produced in the analysis of *C. lamprauges* isolates by RAPD technique.

Oligonucleotide	Sequence 5'-3'	<i>Amplicons</i>	
		Total	Polymorphic
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	79	15
OPB7	GGTGACGCAG	58	12
P22	AATCGGGCTG	89	15
P50	ACGGCGTATG	93	18
P51	CATCCGTGCT	62	12

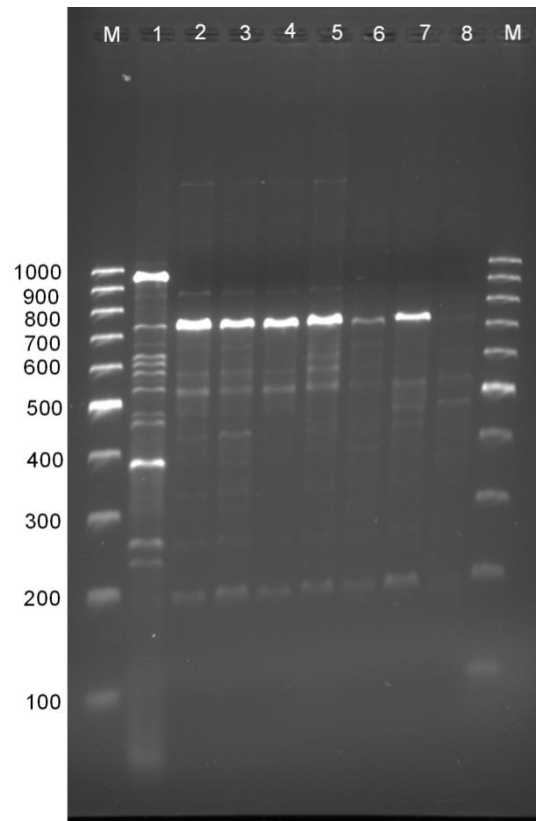


Fig. 1. RAPD profile of isolated *C. lamprauges* with oligonucleotide P50. M: marker; 1: positive control; 2 to 8 (isolated *C. lamprauges*): 2: 40316; 3: 40317; 4: 40315; 5: 40319; 6: 40318; 7: 40320; and 8: 903/13.

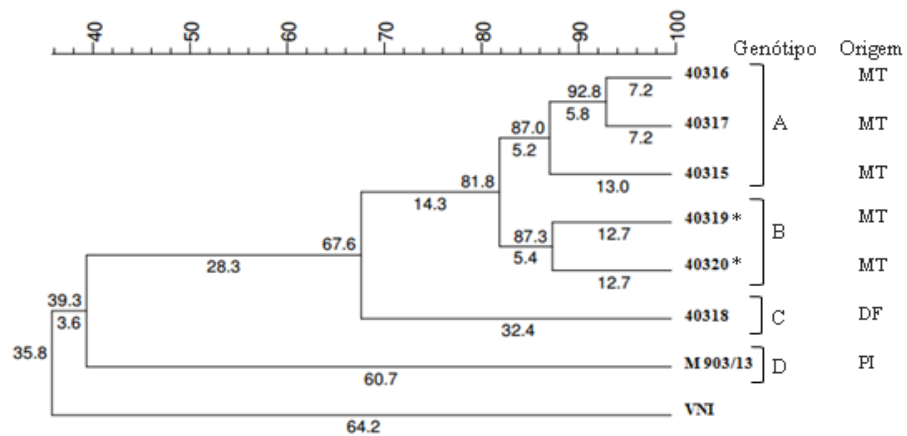


Fig. 2. Dendrogram of genetic similarity of the seven isolates of *C. lamprauges* obtained by the UPGMA method using the Bio Numerics software with five oligonucleotides. The genetic diversity was calculated based on the DICE coefficient. Isolates marked with (*) originate from animals presenting the rhinofacial infection of conidiobolomycosis.