



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANA REICHERT DA SILVA ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO
DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA UTILIZANDO
ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Paracoccidioides
brasilensis***

TATIANA REICHERT DA SILVA ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO
DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA UTILIZANDO
ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Paracoccidioides
brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono.

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A851d Assunção, Tatiana Reichert da Silva.
Desenvolvimento de método para diagnóstico da paracoccidiodomicose humana utilizando antígeno recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis* / Tatiana Reichert da Silva Assunção. – Londrina, 2012.
60 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Paracoccidiodomicose – Diagnóstico – Teses. 2. Paracoccidioides brasiliensis – Teses. 3. Antígenos de fungos – Teses. 4. Micoses fungóides – Teses. I. Ono, Mario Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616.993

TATIANA REICHERT DA SILVA ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA UTILIZANDO ANTÍGENO
RECOMBINANTE DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Elaine Cristina Teixeira Florian
UEL – Londrina - PR

Londrina, 29 de Fevereiro de 2012.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Animal localizado no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. O projeto contou com o apoio financeiro da Fundação Araucária e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Deus, por todo cuidado; à minha família e ao meu noivo por sempre estarem presentes nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por mais essa conquista. Por ter me sustentado e me capacitado a superar cada obstáculo que encontrei durante os dois anos em que estive no mestrado. Agradeço também por ter pessoas ao meu redor às quais posso expressar minha gratidão. Sem elas, não seria possível chegar até aqui.

Ao orientador, Prof. Dr. Mario Augusto Ono, pelos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos, pela paciência e confiança depositada em mim. Agradeço imensamente a oportunidade que me foi dada para meu crescimento profissional.

À Prof^a. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela valiosa contribuição em meu trabalho e por ter aceito o convite em participar da banca de qualificação e de defesa.

À Prof^a. Dra. Elaine Cristina Teixeira Florian, por toda ajuda nos experimentos, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência ao sanar minhas dúvidas e acima disso, pelo companheirismo e palavras de incentivo. Obrigada também por ter participado da banca de qualificação e de defesa, enriquecendo meu trabalho com preciosas sugestões.

À todos os professores do programa de mestrado em Patologia Experimental, por todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em patologia Experimental, pelo incentivo à pesquisa.

Às Prof^a. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche e Helena Kaminami Morimoto e à técnica do laboratório de Imunologia do Hospital Universitário de Londrina, Elizabeth Midori Hayashi, pelas amostras de soros fornecidas.

Agradeço à Prof^a. Dra. Marilda Carlos Vidotto, por toda ajuda e experiência repassada e por disponibilizar as instalações da IgY – Laboratório de Biotecnologia - para realização dos experimentos relacionados à clonagem e produção da proteína recombinante. À todos funcionários e ex-funcionários que por

lá passaram, os quais foram imprescindíveis para realização deste trabalho: Ana Paula Cheirubim, Elisaine Souza, Jeanedy Maria Pazinato, Louise Rejane, Luciana Von Hohendorff, Luis Francisco Majé, Melissa Hirozawa, Renan Requena e Romilaine Souza. Muito obrigada!

À todos os professores do programa de mestrado em Patologia Experimental, por todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em patologia Experimental, pelo incentivo à pesquisa.

À Fundação Araucária e pelo apoio financeiro e à CAPES pela concessão da bolsa.

Aos técnicos de laboratório, Nilson de Jesus Carlos e Mari Sumigawa Kaminami, pela disposição de sempre em ajudar.

Aos meus companheiros de laboratório Aline Omori, Donizete Belitardo, Gabriela Oliveira, Igor Massahiro, Isabele Kazahaya, Maria Luiza Azevedo, Melina Galvão, Monica Sbeghen, obrigada pelos momentos de descontração e auxílio com os experimentos. Em especial aos amigos Aline Amaral e Atilio Calefi pelo companheirismo e ajuda, pelas risadas que demos juntos, pelas descobertas e também por compartilharem comigo os momentos de dúvida e insegurança.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial Elaine Delicato de Almeida, Lilian De Dio, Poliana Marinelo, Sandra Mizokami e Suelen Santos, por compartilharem os bons momentos e também os de aflição e dúvida.

Aos meus pais, por todo apoio e incentivo, paciência nos momentos de estresse e desânimo e por terem me dado a oportunidade de seguir em frente e realizar meus sonhos.

Às minhas irmãs, irmãos, cunhados e cunhada, por toda ajuda e por compreenderem os inúmeros momentos em que estive ausente, me dedicando para concluir mais essa importante etapa em minha vida.

Às minhas amadas sobrinhas Giovanna e Isabella Trindade, Gabriela

Mesquita e ao meu querido sobrinho Davi Zanon, pelos momentos de alegria, pelas brincadeiras e por tornarem minha vida mais leve. Amo vocês!

Em especial ao meu noivo Renan Dupas, por sempre ter apoiado minhas decisões e nunca ter medido esforços em me ajudar. Pelo companheirismo, pelo incentivo, pelas palavras nas horas difíceis e por compartilhar comigo mais essa conquista.

Aos meus amados amigos, irmãos na fé, Shirlle Oliveira, Larissa Patsko, Rafael Torres, Fernanda Valentim, Elisana Cabulon, Adriano e Gislene Souza, Jackeline Meyer, Renata Case, Michael Neves e Cristiane Romi, pelas orações, amizade e palavras de encorajamento.

À todos aqueles que não mencionei mas contribuíram de alguma forma para conclusão deste trabalho.

*“Se existe uma forma
de fazer melhor,
descubra-a”*

Thomas Edison

ASSUNÇÃO, T. R. S. **Desenvolvimento de método para diagnóstico da paracoccidioidomicose humana utilizando antígeno recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2012. 60 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por *Paracoccidioides brasiliensis*. É considerada a micose sistêmica de maior prevalência na América do Sul, principalmente no Brasil, o qual apresenta o maior número de casos. A glicoproteína de 43 kDa, gp43, é o principal antígeno utilizado no diagnóstico e epidemiologia da PCM. O objetivo deste trabalho foi produzir gp43 recombinante na forma solúvel para utilização no diagnóstico de PCM humana. Para a produção da proteína recombinante, primeiramente o gene *gp43* foi clonado em vetor de expressão pETTEV. Algumas construções do gene neste vetor foram feitas com a finalidade de obter melhor expressão e solubilidade da proteína. Para isso, foram realizadas estratégias para deleção de 20 aminoácidos das regiões N-terminal e/ou C-terminal. A proteína, com deleção na região N-terminal (gp43 Δ Nt), foi produzida em *E. coli* BL21 e purificada por cromatografia de afinidade. Sua reatividade foi avaliada empregando-se soros de pacientes com PCM. A gp43 Δ Nt, apesar de ter sido obtida na forma insolúvel, apresentou semelhanças em relação à gp43 nativa e foi reconhecida por soros de pacientes com PCM nos testes de ELISA indireto, *Western blot* e *dot blot*. Os melhores resultados foram observados quando utilizada em *dot blot*, apresentando 100% de correlação com o teste de Imunodifusão Radial Dupla (IDRD) que é o método mais usado no diagnóstico da micose. Portanto, o teste de *dot blot* com gp43 Δ Nt pode ser útil no diagnóstico da PCM em humanos.

Palavras-chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomicose humana. gp43 recombinante.

ASSUNÇÃO, T. R. S. **Development of method for diagnosis of human paracoccidioidomycosis using recombinant antigen of *Paracoccidioides brasiliensis***. 2012. 60 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. It is considered the most prevalent systemic mycosis in South America, mainly in Brazil, which presents the largest number of cases. The 43 kDa glycoprotein, gp43, is the main antigen used for diagnosis and epidemiology of PCM. The objective of this work was the production of the recombinant gp43 in soluble form for use in the diagnosis of human PCM. For the production of recombinant protein, first the *gp43* gene was cloned in pETTEV expression vector. Some gene constructs in this vector were made in order to obtain better expression and solubility of protein. For this, were carried out strategies for deletion of 20 amino-acid in the N-terminal and/or C-terminal regions. The protein, with deletion in N-terminal (gp43 Δ Nt), was produced at *E. coli* BL21 and purified by affinity chromatography. Its reactivity was evaluated using sera from patients with PCM. The gp43 Δ Nt, despite having been obtained in insoluble form, showed similarities with native gp43 and was recognized by sera from patients with PCM in indirect ELISA test, *Western blot* and *dot blot*. The best results were observed when used in *dot blot*, presenting 100% of correlation with the double radial immunodiffusion test (IDRD), which is the widely used method in the diagnosis of this mycosis. Therefore, dot blot with gp43 Δ Nt may be useful for PCM diagnosis in humans.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. Human paracoccidioidomycosis. Recombinant gp43.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do delineamento experimental.....	27
Figura 2 - Esquema da estratégia de clonagem utilizada.....	29
Figura 3 - Representação do vetor de expressão pETTEV.....	30
Figura 4 - Preparo do inserto gp43ΔNt e vetor pETTEV para clonagem.....	38
Figura 5 - Amplificação do gene e clivagem para confirmação da clonagem de gp43ΔNt em pETTEV.....	39
Figura 6 - Sequência nucleotídica obtida através do sequenciamento do gene <i>gp43ΔNt</i> no vetor pETTEV e alinhamento com a sequência do banco de dados (GenBank AY005437).....	40
Figura 7 - Análise de expressão e solubilidade da proteína recombinante gp43ΔNt em <i>E. coli</i> BL21 Rp.....	41
Figura 8 - Análise de expressão e solubilidade da proteína recombinante gp43ΔNt em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	42
Figura 9 - Purificação da proteína recombinante gp43ΔNt.....	43
Figura 10 - Avaliação da resposta imune humoral de coelho imunizado com gp43ΔNt por ELISA indireto.....	44
Figura 11 - Determinação do título de anticorpos anti-gp43ΔNt produzidos pelo coelho imunizado com proteína recombinante gp43ΔNt (A) e avaliação de identidade com soro de pacientes com PCM (B) por IDRD com exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i>	45
Figura 12 - Avaliação da reatividade do soro anti-gp43ΔNt produzido por coelho imunizado com proteína recombinante gp43ΔNt por <i>Western blot</i> com exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i>	45
Figura 13 - Análise do lisado celular de clone recombinante por <i>Western blot</i>	46
Figura 14 - Análise do reconhecimento de gp43 nativa e recombinante por soros de pacientes e por soro de coelho imunizado com gp43 recombinante gp43ΔNt por <i>dot blot</i>	47
Figura 15 - Teste de reatividade de soros de pacientes e de soro de coelho imunizado com gp43ΔNt com diferentes concentrações de proteína recombinante por <i>dot blot</i>	48

Figura 16 - Análise de reatividade de soros de pacientes e de soro de coelho imunizado com gp43 Δ Nt por *dot blot*.49

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
Bp	Pares de base
BLASTn	Basic Local Alignment Sequence Tool - nucleotide
DAB	3-3'-diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Dioxinucleotídeos trifosfatados
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
gp43ΔNt	Glicoproteína de 43 kDa sem 20 aminoácidos na extremidade N-terminal
Gu-HCl	Hidrocloreto de guanidina
H	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IDRD	Imunodifusão Radial Dupla
IPTG	Isopropilthio-β-D-galactosídeo
kDa	Quilodaltons
Kb	Quilo pares de base
L	Litro
LB	Meio Luria-Bertani
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Ni	Níquel

nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato salino
pcDNA	Plasmídeo de expressão em mamíferos
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmols	Picomols
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
rgp43	Glicoproteína de 43 kDa recombinante
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
seg	Segundo
TEB	Tampão Tris-EDTA-ácido bórico
TMBZ	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
UV	Ultravioleta
V	Volts
YPD	Yeast extract peptone dextrose broth
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	<i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i> e a Paracoccidioidomicose	17
1.2	PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM HUMANOS.....	20
1.3	PROTEÍNAS RECOMBINANTES	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
3.2	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS.....	28
3.3	OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE <i>P. BRASILIENSIS</i>	28
3.3.1	Produção de Exoantígeno de <i>P. Brasiliensis</i>	28
3.3.2	Obtenção de gp43 Nativa	28
3.4	CLONAGEM DO GENE <i>GP43</i> TRUNCADO EM VETOR DE EXPRESSÃO DE <i>E. COLI</i>	29
3.5	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DA CLONAGEM DE <i>GP43ΔNT</i> EM VETOR DE EXPRESSÃO	31
3.6	EXPRESSÃO DA <i>GP43ΔNT</i> RECOMBINANTE EM <i>E. COLI</i>	32
3.7	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE <i>GP43ΔNT</i> EM <i>E. COLI</i>	32
3.8	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA <i>GP43ΔNT</i> RECOMBINANTE	33
3.9	PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI- <i>GP43ΔNT</i> EM COELHO	34
3.10	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>GP43ΔNT</i> POR COELHO IMUNIZADO COM PROTEÍNA RECOMBINANTE E ANÁLISE DA REATIVIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR ELISA INDIRETO	34
3.11	ANÁLISE DA REATIVIDADE DE SORO DE COELHO IMUNIZADO COM PROTEÍNA RECOMBINANTE POR IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA (IDRD).....	35
3.12	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DO SORO DE COELHO IMUNIZADO COM <i>GP43ΔNT</i> E ANÁLISE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR <i>WESTERN BLOT</i>	36
3.13	AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR <i>DOT BLOT</i>	37

4	RESULTADOS	38
4.1	CLONAGEM DE GP43 TRUNCADA EM VETOR PETTEV	38
4.2	ANÁLISE DO CLONE GP43 Δ NT EM PETTEV POR SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	39
4.3	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GP43 Δ NT	41
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA GP43 Δ NT	43
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Paracoccidioides brasiliensis* E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de natureza granulomatosa e evolução crônica, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Diniz et al., 2002). É uma das mais prevalentes micoses sistêmicas da América Latina, acometendo principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino (Puccia et al., 1986; Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993). No Brasil, entre os anos de 1980 a 1995, a PCM foi considerada a oitava causa de mortes por doença crônica entre as doenças infecciosas ou parasitárias e as regiões com maior prevalência foram as regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (Coutinho et al., 2002).

O dimorfismo do *P. brasiliensis* é termodependente, apresentando-se na forma de micélio à 25°C e na forma de levedura quando cultivado à 37°C ou nos tecidos do hospedeiro (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993). Essa transição para a forma de levedura no hospedeiro é essencial tanto para a sobrevivência do patógeno como para a invasão tecidual (Franco, 1986; San-Blas e Ninõ-Vega, 2008).

Acredita-se que o habitat natural do *P. brasiliensis* seja o solo (Restrepo, 1985) e que a infecção ocorra através da inalação de propágulos do fungo (Franco, 1986; Camargo e Franco, 2000). Existem poucos isolados do fungo obtidos a partir do solo (Negroni, 1966; Albornoz, 1971; Silva-Vergara et al., 1998) e várias tentativas de isolamento não foram bem sucedidas. Ono e colaboradores (2002) observaram que agrotóxicos como fungicidas, inseticidas e herbicidas inibem o crescimento de *P. brasiliensis* “in vitro” de forma dose-dependente e que possivelmente esse seja um dos fatores que dificultam o seu isolamento a partir de amostras de solo.

Na maioria dos casos a infecção apresenta-se assintomática, porém alguns pacientes desenvolvem sinais e sintomas da doença resultando na forma aguda ou subaguda (forma clínica presente na criança e no adolescente) ou mais freqüentemente, na forma crônica (forma clínica do adulto) (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

As manifestações clínicas da PCM vão desde lesões localizadas em pulmão, pele, mucosa oral, faringe e/ou laringe, a lesões mais graves em outros órgãos resultantes da disseminação via circulação sanguínea e linfática (Diniz et al., 2002). Ocorre associação com tuberculose em 5,5 a 25% dos casos de PCM, induzindo ao erro no diagnóstico e na conduta terapêutica (Paniago et al., 2003; Bittencourt, Oliveira e Coutinho, 2005; Quagliato et al., 2007). Além disso, é necessário um diagnóstico diferencial da PCM com várias outras doenças como histoplasmose, sarcoidose, coccidioomicose, doença de Hansen e linfomas (Bittencourt, Oliveira e Coutinho, 2005).

O diagnóstico definitivo da PCM é obtido por meio da identificação do fungo em espécimes clínicos, como escarro, raspado de lesões cutâneas e de mucosas, aspirado ganglionar ou de material obtido por broncoscopia (Camargo e Franco, 2000; Wanke e Aidê, 2009). A cultura também pode ser útil, no entanto o resultado demora semanas (Wanke e Aidê, 2009). Os testes sorológicos, por outro lado, fornecem resultados rápidos e constituem uma importante ferramenta no diagnóstico da PCM (Camargo et al., 1988).

Pacientes com a forma clínica grave de PCM apresentam deficiência na resposta imune celular ao *P. brasiliensis*. O fungo cresce em grande quantidade, aumentando a carga antigênica e a resposta humoral contra os antígenos do fungo, demonstrando correlação direta entre resultado sorológico e gravidade da doença (Franco, 1986; Del Negro et al., 2000; Diniz et al., 2002). Os testes sorológicos, portanto, são úteis não somente no diagnóstico da PCM, mas também no acompanhamento dos pacientes em tratamento (Puccia et al., 1986; Diniz et al., 2002).

A maioria dos ensaios sorológicos empregam antígenos brutos obtidos a partir de filtrados de cultura do fungo (Camargo et al., 1988; Taborda e Camargo, 1994), que podem conter componentes comuns a outros fungos e apresentar reações cruzadas com outras micoses como histoplasmose, candidíase e doença de Jorge Lobo (Puccia e Travassos, 1991; Taborda e Camargo, 1994; Camargo e Franco, 2000). Além disso, diferenças em relação ao meio de cultura utilizado, cepa do fungo, quantidade de inóculo e tempo de incubação (Puccia et al., 1986) dificultam a padronização na produção desses antígenos (Camargo et al., 1988; Taborda e Camargo, 1994; Camargo e Franco, 2000).

O principal componente do exoantígeno de *P. brasiliensis*, uma glicoproteína de 43 kDa (gp43), foi descrito por Puccia e colaboradores em 1986. A gp43 pode ser isolada a partir do sobrenadante da cultura do fungo através de cromatografia de afinidade (Puccia e Travassos, 1991) e tem sido empregada em vários testes sorológicos para o diagnóstico e estudo epidemiológico da PCM (Puccia et al., 1986; Costa et al., 2010). Com o tratamento eficaz observa-se redução nos níveis de anticorpos anti-gp43 e restauração da imunidade celular do paciente (Mendes-Giannini et al., 1990).

A gp43 é reconhecida pela maioria dos soros de pacientes com PCM (Taborda e Camargo, 1994), porém também pode apresentar reatividade cruzada em testes que utilizam o antígeno imobilizado como o ELISA, provavelmente devido à presença de resíduos de galactofuranose na porção terminal da cadeia oligossacarídica (Puccia e Travassos, 1991).

Tentativas em extinguir reação cruzada através de tratamento da gp43 com metaperiodato de sódio para eliminar a porção carboidrato e processos de adsorção de soro com antígenos de *H. capsulatum* ou *C. albicans*, não foram eficazes, demonstrando a dificuldade em obter um teste específico e definitivo no diagnóstico da PCM (Albuquerque, Silva e Camargo, 2005).

Nas últimas décadas vários estudos foram realizados para obtenção de antígenos mais sensíveis e específicos para utilização no diagnóstico sorológico da PCM (Blumer, Jalbert e Kaufman, 1984; Restrepo, Cano e Ochoa, 1984; Camargo et al., 1988). Com o objetivo de eliminar reações cruzadas, pesquisadores têm utilizado técnicas de biologia molecular para produção de antígenos recombinantes, entre eles a gp43 (Taba et al., 1989; Cisalpino et al., 1996; Diniz et al., 2002; Carvalho et al., 2008). Tais antígenos podem ser produzidos em grande quantidade, facilitando o processo de padronização e reduzindo reações-cruzadas, uma vez que proteínas recombinantes expressas em bactérias não apresentam a porção carboidrato (Diniz et al., 2002).

A primeira tentativa em expressar a gp43 recombinante foi descrita por Taba e colaboradores (1989), que demonstraram o reconhecimento do antígeno recombinante por soros de pacientes com PCM. Cisalpino e colaboradores (1996) caracterizaram a seqüência completa do gene que codifica a gp43. No mesmo estudo, foi clonada a porção interna e a região C-terminal da gp43 em *Escherichia coli* e observou-se reação da proteína obtida com soro de pacientes com PCM no

teste de *immunoblot*. Além disso, anticorpo de coelho anti-gp43 recombinante reconheceu o antígeno nativo obtido de filtrado de cultura de *P. brasiliensis* no teste de *immunoblot*.

Diniz e colaboradores (2002) analisaram por *immunoblot* a reatividade da gp43 recombinante processada (retirando-se 35 aminoácidos da porção N-terminal) e dos fragmentos das regiões C-terminal, interna e N-terminal expressos em *E. coli*. Apesar de a proteína estar na forma insolúvel, todos os soros de pacientes com PCM testados reconheceram a gp43 recombinante processada e entre os fragmentos avaliados, o fragmento C-terminal foi o mais antigênico. A baixa reatividade dos soros em relação aos fragmentos ocorreu provavelmente devido à perda de epítomos conformacionais, os quais são reconhecidos pelo soro humano (Puccia e Travassos, 1991). Além disso, não foi observada reação cruzada da gp43 recombinante com soros de pacientes com aspergilose, candidíase e histoplasrose.

Carvalho e colaboradores (2008) compararam a gp43 recombinante solúvel expressa em *Pichia pastoris* com gp43 nativa nos testes de imunodifusão e *dot blot*. A proteína, que apresentou-se glicosilada, demonstrou ser específica para PCM no teste de imunodifusão, porém em *dot blot* só foi alcançada 100% de especificidade após tratamento com metaperiodato ou através de deglicosilação enzimática.

1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM HUMANOS

Os primeiros casos de PCM humana foram descritos em 1908 por Adolfo Lutz, relatando dois casos de pacientes que apresentavam lesões nasofaríngeas (Lutz, 1908). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas com *P. brasiliensis* em áreas endêmicas na América Latina e que 2% destas podem vir a desenvolver a doença (McEwen et al., 1995).

Cerca de 90% dos casos de PCM ocorrem em homens e a faixa etária mais acometida situa-se entre 30 e 50 anos de idade. Os indivíduos acometidos pela doença normalmente encontram-se na fase mais produtiva da vida, levando a um impacto social e econômico (Shikanai-Yasuda et al., 2006). A micose é pouco freqüente abaixo dos 14 anos de idade, não existindo predomínio de sexo neste grupo (Paniago et al., 2003).

Experimentos “in vitro” demonstraram que o hormônio beta-estradiol presente em mulheres adultas retarda ou inibe especificamente a transição da fase micelial infectante para a fase leveduriforme impedindo a adaptação do fungo nos tecidos do hospedeiro (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993).

A PCM é endêmica em populações da zona rural e a maioria dos pacientes exerceu atividade agrícola nas duas primeiras décadas de vida (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Wanke e Aidê, 2009). Trabalhadores rurais normalmente possuem baixo nível socioeconômico e geralmente são tabagistas e etilistas crônicos (Camargo e Franco, 2000). Estudos demonstraram que o tabagismo e alcoolismo representam fatores de risco para o desenvolvimento da micose, pois interferem na formação de granulomas e nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Martinez e Moya, 1992; Santos et al., 2003).

A PCM recebeu vários sinônimos como blastomicose, blastomicose sul-americana e blastomicose brasileira (Franco et al., 2006). O termo PCM foi recomendado e adotado em 1971 (Pan-American Health Organization, 1974), deixando a denominação blastomicose limitada à infecção causada pelo fungo *Blastomyces dermatitidis*, endêmico na América do Norte e em vários países africanos, o qual não foi relatado até o momento no Brasil. Apesar disso, cerca de 46% da mortalidade relatada no país por *P. brasiliensis* entre 1980 e 1995 foram registrados sob o termo blastomicose (Coutinho et al., 2002).

A classificação da PCM utilizada atualmente foi estabelecida pelo Consenso Brasileiro em paracoccidioidomicose (2006) a partir de modificações do Colóquio Internacional em paracoccidioidomicose realizado em 1986 (Franco, 1986). A classificação baseia-se nos dados clínicos e na história natural da doença (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Apenas uma parcela muito pequena dos indivíduos expostos ao *P. brasiliensis* desenvolvem manifestações clínicas da doença. Na maioria dos casos, o fungo pode permanecer em focos quiescentes por décadas ou ser eliminado pelo hospedeiro (Franco, 1986). A PCM-infecção, como é denominada, acomete indivíduos de ambos os sexos, aparentemente saudáveis, que residem ou residiram em áreas endêmicas e que apresentam reação intradérmica positiva à paracoccidioidina (Franco, 1986; Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A PCM-doença pode ser subdividida em forma aguda e forma crônica. A forma aguda representa 3 a 5% dos casos e ocorre principalmente em crianças e adolescentes de ambos os sexos (Shikanai-Yasuda et al., 2006). É a forma mais grave de PCM, apresenta rápida progressão e disseminação pelo sistema linfático levando à linfadenopatia e, nos casos mais graves, intensa hepatoesplenomegalia e dano em outros órgãos (Diniz et al., 2002). É raro o comprometimento pulmonar (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A forma crônica é a forma mais comum de PCM-doença e acomete sobretudo homens adultos (Diniz et al., 2002). Apresenta-se na maioria dos casos localizada a apenas um órgão, geralmente nos pulmões (forma localizada ou unifocal), porém pode disseminar-se por via linfática ou sangüínea para órgãos extrapulmonares caracterizando a forma disseminada ou multifocal (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A PCM é uma doença granulomatosa crônica que leva à fibrose mesmo com o tratamento adequado. Trata-se da forma residual ou sequelar da doença sendo o pulmão o órgão mais afetado. Fibrose pulmonar foi observada em cerca de 50% dos pacientes com infecção crônica nos pulmões evoluindo em alguns casos para doença pulmonar obstrutiva crônica. Outras manifestações cicatriciais também foram descritas em glândula adrenal, sistema nervoso central, mucosas e pele (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Santos et al., 2003; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Por ser uma doença sem notificação compulsória no Brasil, não existem dados precisos sobre a incidência de PCM (Wanke e Aidê, 2009), porém, de acordo com inquéritos epidemiológicos e relatos de casos, acredita-se que a incidência anual em zonas rurais endêmicas varie de 3 a 4 novos casos/1.000.000 de habitantes até 1 a 3 novos casos/100.000 habitantes (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A PCM foi responsável por 3.181 óbitos no Brasil entre 1980 e 1995 apresentando média anual de 198,81 mortes. A taxa de mortalidade por milhão de habitantes no mesmo período foi de 1,45 casos, superando doenças como criptococose (0,33 casos por milhão de habitantes), pneumocitose (0,13 casos por milhão de habitantes) e histoplasmoze (0,04 casos por milhão de habitantes). Neste período, a PCM destacou-se como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as doenças infecciosas e parasitárias

e a mais alta taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (Coutinho et al., 2002).

Bittencourt, Oliveira e Coutinho (2005) observaram que 85% dos casos de óbito por PCM no estado do Paraná ocorreram em pacientes do sexo masculino com maior prevalência entre 30 e 59 anos de idade, corroborando com dados descritos na literatura sobre os casos de PCM no Brasil (Coutinho et al., 2002; Blotta et al., 1999).

No mesmo estudo, Bittencourt, Oliveira e Coutinho (2005) relataram que no estado do Paraná entre os anos de 1980 e 1998, 62,8% dos indivíduos que vieram a óbito por PCM possuíam uma profissão definida e destes, 67,9% eram trabalhadores rurais. A atividade agrícola é a profissão predominante entre os indivíduos que adquiriram e foram a óbito por PCM (Bittencourt, Oliveira e Coutinho, 2005; Blotta et al., 1999).

Sendo assim, a PCM representa um importante problema de saúde pública devido à quantidade de mortes prematuras que provoca, principalmente em trabalhadores rurais, e também devido ao seu alto potencial incapacitante (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Wanke e Aidê, 2009). Além disso, a falta de programas de controle ou de padronização no diagnóstico de PCM no país (Coutinho et al., 2002), aliados a deficiências de acesso e suporte da rede de serviços de saúde contribuem para um diagnóstico tardio (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

1.3 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Proteínas puras, solúveis e funcionalmente ativas são de grande importância na biotecnologia moderna para fins científicos, terapêuticos ou comerciais (Baneyx e Mujacic, 2004; Sorensen e Mortensen, 2005). Fontes naturais de proteínas são de difícil obtenção em uma quantidade adequada para uso. Sendo assim a tecnologia recombinante é freqüentemente o método de escolha para obtenção de proteínas em grande escala (Yokoyama, 2003; Sorensen e Mortensen, 2005).

A bactéria *Escherichia coli* é o organismo mais utilizado para expressão de proteínas heterólogas por ser um sistema de expressão relativamente simples, barato, facilmente cultivável em fontes econômicas de carbono, de

crescimento rápido e seu genoma e vias metabólicas são bem conhecidos (Baneyx e Mujacic, 2004; Cornvik et al., 2006; Sorensen e Mortensen, 2005).

No entanto, essa estratégia nem sempre é bem-sucedida e a expressão de proteínas eucarióticas em *E. coli* pode resultar em acúmulo de proteínas-alvo em agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. Tais agregados protéicos são formados principalmente por proteínas desdobradas ou dobradas incorretamente, incapazes em atingir sua conformação nativa e que interagem entre si por ligações hidrofóbicas (Middelberg, 2002; Yokoyama, 2003; Gasser et al., 2008).

A expressão de proteína recombinante em grande quantidade em *E. coli* resulta em consumo excessivo de chaperonas, moléculas modulatórias que auxiliam o dobramento correto da proteína sintetizada ou que previnem sua agregação, levando à deposição na forma de agregados insolúveis (Carrió e Villaverde, 2002; Gasser et al., 2008). Além disso, a bactéria não possui mecanismos que permitem todas as modificações pós-traducionais necessárias para o dobramento correto da proteína, o que também contribui na formação de corpos de inclusão (Baneyx e Mujacic, 2004).

Para isolamento da proteína produzida, esses agregados protéicos devem ser solubilizados utilizando-se altas concentrações de agentes desnaturantes após rompimento prévio das células bacterianas por sonicação. Os agentes desnaturantes mais utilizados são a uréia e guanidina hidrocloreada, a qual foi empregada nos protocolos neste estudo (Vallejo e Rinas, 2004).

Os corpos de inclusão são formados principalmente por proteína alvo, mas também contém contaminantes como proteínas de membrana, componentes ribossomais e pequena quantidade de fosfolipídios e ácidos nucleicos (Baneyx e Mujacic, 2004). Sendo assim, recomenda-se que a proteína seja submetida a processos de purificação após seu isolamento (Vallejo e Rinas, 2004).

Várias tentativas têm sido descritas na literatura com a finalidade de transformar proteínas insolúveis em frações citoplasmáticas solúveis (Middelberg, 2002; Sorensen e Mortensen, 2005). Apesar de não existir um método universal de redobramento de proteínas purificadas a partir de corpos de inclusão, os processos mais utilizados são diálise, sistemas de diafiltração e métodos de cromatografia para remoção do agente desnaturante ou diluição direta em tampões de redobramento que permitem a formação da estrutura nativa da proteína (Vallejo e Rinas, 2004). No

entanto, trata-se de processos empíricos e apresentam baixo rendimento (Carrió e Villaverde, 2002; Sorensen e Mortensen, 2005).

Outra alternativa consiste no desenvolvimento de novas estratégias para expressão de proteínas na forma solúvel. Os mais empregados são cultivo dos clones positivos em temperaturas mais baixas, utilização de outras cepas de *E. coli* competente que melhora a expressão de proteína solúvel e alterações no pH do meio de cultivo (Sorensen e Mortensen, 2005).

Em um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, mesmo com redução da temperatura de indução, utilização de outras cepas de célula competente e variações nas concentrações de agente indutor não foi possível obter a expressão de gp43 solúvel (Borges, 2011).

Cornvik e colaboradores (2006) obtiveram com sucesso a expressão de proteínas na forma solúvel ao retirar a porção N-terminal de proteínas consideradas difíceis de expressar. Esses autores sugeriram que o mesmo pode ser realizado com a porção C-terminal ou empregar deleção combinada de N-terminal e C-terminal para o mesmo objetivo.

Sendo assim, neste estudo foi utilizada a gp43 com suas extremidades truncadas, retirando-se 20 aminoácidos das regiões N e/ou C-terminais, na tentativa de obtê-la na forma solúvel, facilitando a purificação e otimização no emprego em testes sorológicos para o diagnóstico da PCM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir antígeno de *P. brasiliensis* recombinante rgp43 para utilização no imunodiagnóstico de PCM humana.

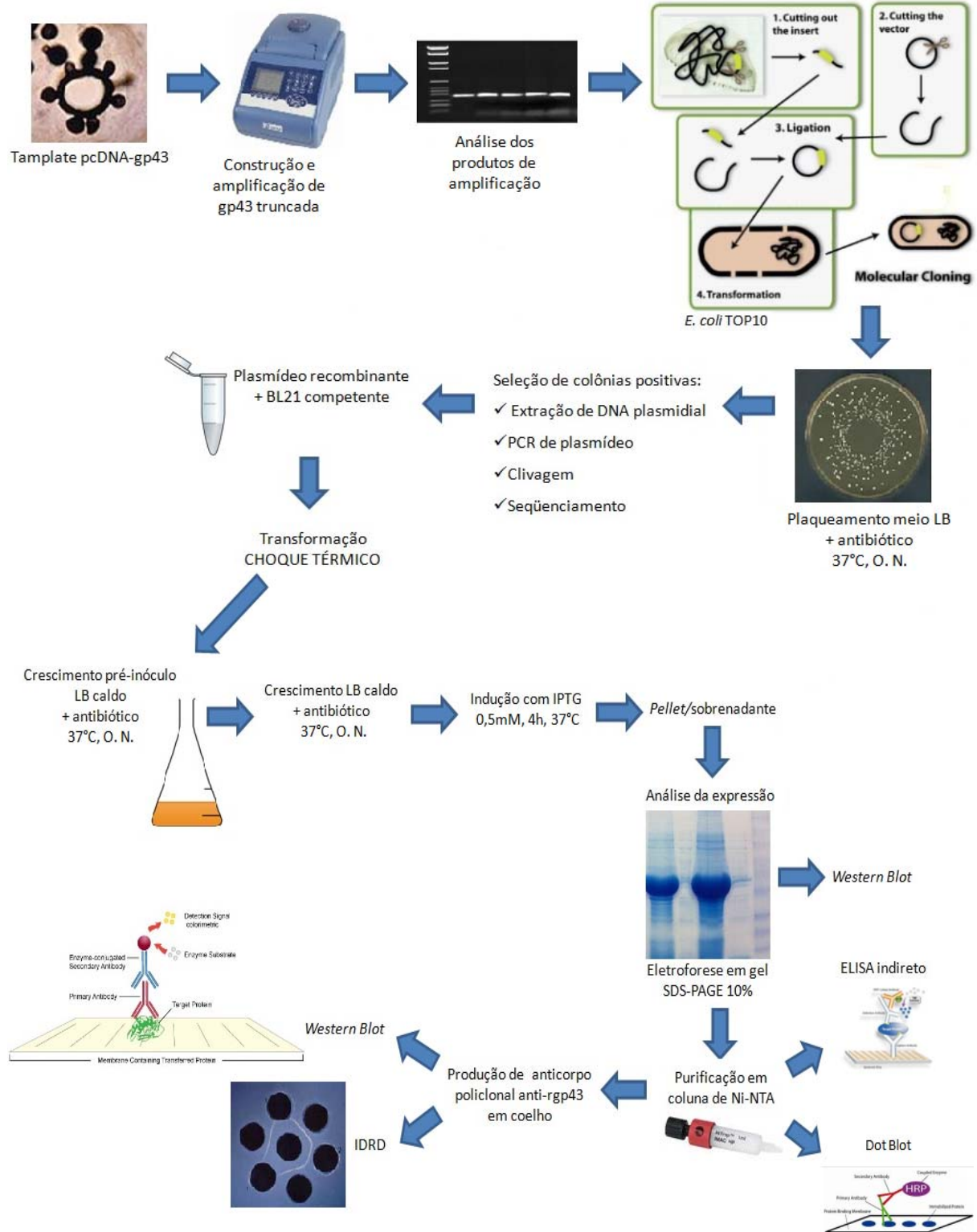
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar gp43 em vetor de expressão de *E. coli*
- Produzir e purificar a gp43 recombinante na forma solúvel em *E. coli*
- Caracterizar a gp43 recombinante por *Western blot*, *dot blot* e ELISA indireto
- Analisar a reatividade de soros de indivíduos soropositivos e soronegativos para PCM com gp43 nativa e recombinante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 1 - Representação esquemática do delineamento experimental.



3.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS

Os soros humanos utilizados neste trabalho foram provenientes de pacientes suspeitos ou em tratamento para PCM, atendidos no Hospital Universitário de Londrina – UEL, totalizando 89 amostras de soros de 64 pacientes diferentes (77 amostras negativas e 12 positivas pela Imunodifusão Radial Dupla - IDRD). Todas as amostras foram previamente submetidas ao teste de IDRD com exoantígeno de *P. brasiliensis*, que é o método sorológico utilizado pelo Laboratório de Imunologia Clínica (HU – UEL). Para controle negativo foram coletadas também amostras de sangue de indivíduos soronegativos para PCM (alunos e funcionários da UEL).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL (Parecer da aprovação nº 114/10, 21/07/2010).

3.3 OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE *P. Brasiliensis*

3.3.1 Produção de Exoantígeno de *P. Brasiliensis*

A obtenção de exoantígeno *P. brasiliensis* foi realizada conforme descrito por Camargo e colaboradores (2003) com algumas modificações. Células de *P. brasiliensis* (cepa B-339, gentilmente cedida pelo prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, Unifesp, SP) cultivadas em meio Sabouraud (Neogen) por 7 dias, à 37°C, foram inoculadas em 50 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%), sob agitação à 80rpm, à 37°C, durante 3 dias. Após esse período, a cultura foi transferida para 250 mL de meio YPD e mantida sob agitação à 80rpm, 37°C por 7 dias. O fungo foi inativado com solução de Timerosal 0,02% e a cultura foi filtrada. O sobrenadante foi liofilizado, dialisado contra água destilada e tampão PBS e a quantidade de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976).

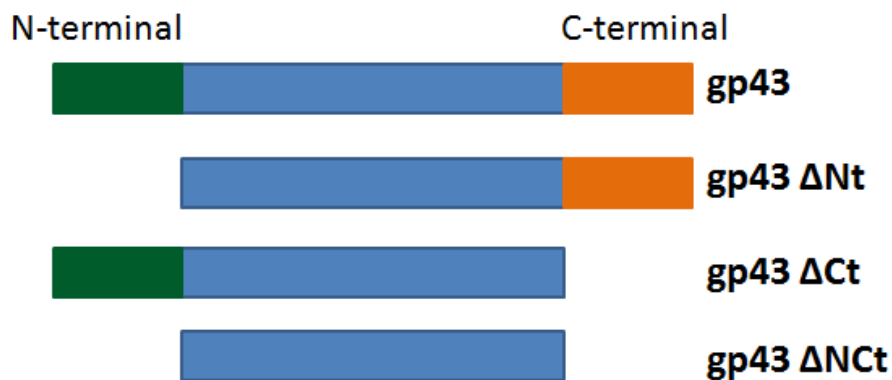
3.3.2 Obtenção de gp43 Nativa

A proteína gp43 nativa foi purificada a partir da aplicação de exoantígeno de *P. brasiliensis* em coluna de afinidade acoplada com anticorpos monoclonais anti-gp43.

3.4 CLONAGEM DO GENE *gp43* TRUNCADO EM VETOR DE EXPRESSÃO DE *E. coli*

Na tentativa de obter a proteína recombinante na forma solúvel, a *gp43* recombinante (*rgp43*) foi produzida de forma truncada na extremidade N-terminal e/ou na extremidade C-terminal (*gp43* Δ Nt, *gp43* Δ Nct e *gp43* Δ Ct respectivamente) retirando-se 20 aminoácidos de cada região (figura 2). Até o momento obtivemos resultados satisfatórios apenas com a construção *gp43* Δ Nt, portanto, os dados apresentados referem-se a essa construção.

Figura 2 - Esquema da estratégia de clonagem utilizada.



Foram retirados 20 aminoácidos das regiões N e/ou C-terminais dando origem às construções de *gp43* com as extremidades truncadas, as quais denominamos *gp43* Δ Nt, *gp43* Δ Nct e *gp43* Δ Ct respectivamente.

O fragmento de *gp43* truncada na região N-terminal foi obtido e amplificado através da reação de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos construídos a partir da seqüência nucleotídica do gene *gp43* do banco de dados (GenBank, código de acesso AY005437). O *primer forward* (*gp43* Δ Nt-F) utilizado possui a seguinte seqüência 5'–GCTAG**GCTAGCG**CATCCGCATCATCTCACGTC-3' apresentando sítio de recombinação para a enzima de restrição *NheI* destacada em negrito na extremidade 5' e o *primer reverse* *gp43*Rev. (5'–CGC**GAATTC**TCACCTGCATCCACCATAC-3') com sítio de restrição para a enzima *EcoRI* (em negrito).

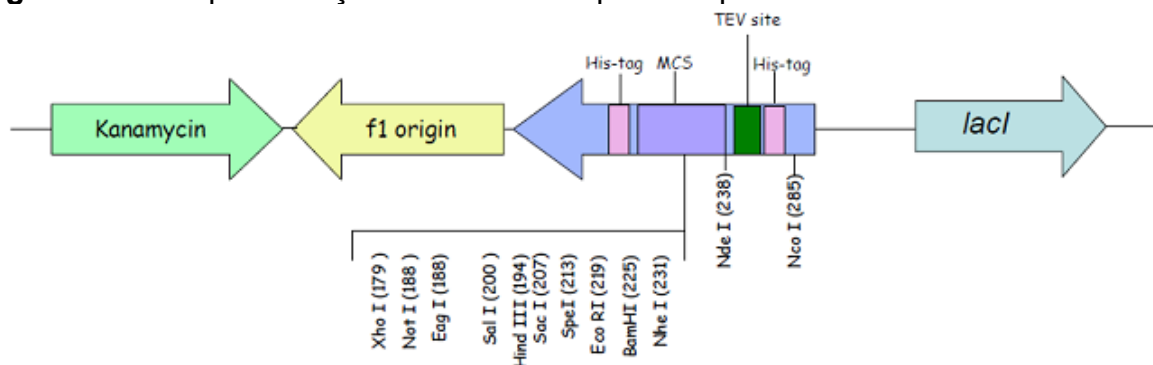
A reação de PCR foi realizada empregando-se como molde a construção do gene *gp43* no vetor pcDNA3.1 (Petroni, 2009). A reação de amplificação foi conduzida em um volume final de 25 μ L, utilizando uma unidade da

enzima *taq* DNA polimerase® 5U/μl (Invitrogen), 20pmols de cada *primer*, 0,2mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 2,5mM de MgCl₂ e tampão da PCR 1X (20mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl) em Termociclador Biocycler Peltier Thermal Cycler nas seguintes condições: 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, finalizando com extensão realizada a 72°C por 7 min.

Uma alíquota (5 μL) do fragmento amplificado foi então analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) preparado em tampão TEB 1X (89mM Tris-base pH 8,2, 89mM ácido bórico, 2,5mM EDTA) e SYBR® Safe DNA Gel Stain 1X (Invitrogen) para verificar a qualidade da reação, sendo posteriormente observado sob luz UV utilizando o transluminador Safe Imager™ Invitrogen.

O produto de PCR foi precipitado com 1/10 do volume de NaCl 5M e 2 volumes de Etanol 100% gelado à -20°C e clivado com enzima de restrição *NheI* à 37°C por 18 h e em seguida com a enzima *EcoRI* por 4 h à 37°C. O vetor de expressão pETTEV (mostrado na figura 3, modificado a partir do vetor pET28a, Novagen, produzido e gentilmente cedido pelo Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Campinas, SP) foi linearizado através de digestão com as mesmas enzimas de restrição sob as mesmas condições, para posterior ligação do fragmento.

Figura 3 - Representação do vetor de expressão pETTEV.



O sítio da protease trombina do vetor pET28a (Novagen) foi substituído pelo sítio da protease TEV originando o vetor pETTEV. O vetor pETTEV possui um tamanho de aproximadamente 5,4 kb. Fonte: Carneiro, 2010.

Após clivagem do gene de interesse e do vetor de expressão ambos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados a partir do gel utilizando-se o kit PureLink™ Quick Gel Extration and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). Posteriormente, uma alíquota foi aplicada em gel de agarose 1% para

verificar a purificação e analisar a concentração dos produtos comparando-se a intensidade das bandas com o padrão λ DNA/*Hind* III Fragments (Invitrogen).

A reação de ligação foi então realizada na proporção 3:1 (inserto:vetor), contendo enzima T4 DNA ligase (Invitrogen™), tampão e água milli-Q para um volume de 20 μ L, em termociclador (Biocycler Peltier Thermal Cycler), a 16°C por 18 h.

Um volume de 5 μ L de cada reação de ligação foi utilizado na transformação de células de *E. coli* TOP10 competentes (Invitrogen) por choque térmico. O produto da transformação foi semeado em meio LB sólido (1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extrato de levedura, 0,5% (p/v) cloreto de sódio, 1,5% (p/v) agar), acrescido de Kanamicina a 50 μ g/mL, e incubado à 37°C, *overnight*. Após esse período, as placas foram avaliadas para seleção de clones recombinantes e algumas colônias foram escolhidas ao acaso. As colônias foram cultivadas em 4 mL de LB caldo (1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extrato de levedura, 0,5% (p/v) cloreto de sódio, 1,5%) seletivo (Kanamicina 50 μ g/mL) sob agitação à 37°C *overnight* e realizada a extração do DNA plasmidial por fervura. Após extração, a presença do gene de interesse foi verificada através de reação de PCR, utilizando os *primers* específicos para amplificação de gp43 Δ Nt. Como controle negativo da reação de PCR foi utilizada água ultra pura.

Os clones positivos foram cultivados em 100 mL de meio LB caldo seletivo e o plasmídeo recombinante foi extraído e purificado através do Plasmid Midi Kit (Qiagen). Para a confirmação da clonagem, o plasmídeo foi digerido com enzimas de restrição (*Nhe*I à 37°C por 18 h seguido por clivagem com *Eco*RI por 4 h à 37°C) para liberação do fragmento inserido no vetor. Os clones que liberaram o fragmento foram submetidos ao seqüenciamento para verificar a integridade da seqüência nucleotídica do inserto.

3.5 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DA CLONAGEM DE gp43 Δ Nt EM VETOR DE EXPRESSÃO

O seqüenciamento do gene gp43 Δ Nt foi executado no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP) utilizando o sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). As reações foram realizadas empregando-se

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), *primer forward* do vetor pETTEV que anela no promotor T7 e *primer reverse* gp43Rev. do gene *gp43ΔNt*.

As sequências obtidas foram editadas pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor e analisadas pelo programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov) para verificar a presença e orientação correta do inserto e a ocorrência de eventuais mutações.

3.6 EXPRESSÃO DA gp43ΔNt RECOMBINANTE EM *E. coli*

Após confirmação da clonagem, o plasmídeo recombinante foi utilizado na transformação de células de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) One Shot® e *E. coli* BL21 CodonPlus®RP competentes por choque térmico. As células foram cultivadas em LB caldo seletivo, contendo Kanamicina 50µg/mL para cultura com *E. coli* BL21(DE3) e Kanamicina na mesma concentração e Cloranfenicol 20µg/mL para *E. coli* BL21 Rp, sob agitação a 37°C, *overnight*.

Em seguida, os pré-inóculos foram transferidos a uma concentração de 2% em um novo LB caldo seletivo e cultivado sob as mesmas condições acima, até que atingissem um valor de densidade óptica a 600nm (D.O._{600nm}) entre 0,6 e 0,7. A expressão foi induzida pela adição de isopropilthio-β-D-galactosídeo (IPTG; Invitrogen™ Life Technologies) a 0,5mM durante 4 h. Amostras de 1 mL foram coletadas antes da indução, após 1 h, 2 h e ao final da indução para posterior análise da expressão em eletroforese em gel SDS-PAGE 10%.

3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE gp43ΔNt EM *E. coli*

As alíquotas separadas durante a indução foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de lise (Tris 0,1M pH 7,0, EDTA 1mM, lisozima 0,1mg/mL). Após incubação em gelo por 30 min, a mistura foi sonicada por ultra-som em banho de gelo por 6 vezes de 10 seg (Sonopuls Ultrasonic Homogenizers, Bandelin) e novamente centrifugada. O sobrenadante (que contém proteínas solúveis) foi separado para análise. O *pellet*, que contém proteínas insolúveis, foi ressuspensado em novo tampão (Tris 0,1M pH 8,0, NaCl 1,5M e EDTA 20mM)

sonicado em gelo (3 ciclos de 10 seg) e centrifugado restando apenas corpos de inclusão como fração insolúvel. Ao sobrenadante e ao *pellet* foram adicionados tampão de amostra (Tris-HCl 0,025M pH 6,8, 2% SDS, 15% glicerol, 2,5% 2-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol 0,004%), e após fervura por 5 min foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE 10% de acordo com protocolo descrito por Laemmli (1970).

Ao término da corrida, os géis foram corados com solução Azul de Coomassie (metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 7% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue (BIO-RAD) 0,25% (p/v)) por 1 a 2 h sob agitação e descorados em solução de metanol 80% (v/v) e ácido acético glacial 20% (v/v) até o desaparecimento da coloração de fundo.

3.8 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA gp43ΔNt RECOMBINANTE

Após confirmação da expressão da proteína, 2% da cultura contendo os plasmídeos recombinantes foram crescidas em 500 mL de LB caldo seletivo. O inóculo foi incubado à 37°C sob agitação até atingir D.O._{600nm} entre 0,6 - 0,7 e, após indução com IPTG 0,5mM por 4 h, a cultura foi centrifugada. Para um teste inicial de purificação, células provenientes de 50 mL desta cultura foram utilizadas.

A proteína recombinante foi expressa fusionada a uma cauda de poli-histidina (6xHis tag) e purificada em coluna contendo resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen®). Previamente, as células foram ressuspensas em tampão A (NaH₂PO₄ 50mM, pH 8,0, NaCl 300mM, lisozima 0,1mg/mL, PMSF 1mM) e incubado em gelo por 30 min. Em seguida, a mistura foi sonicada em gelo (7 ciclos de 10 seg), centrifugada e o *pellet* formado, ressuspensado em tampão B (NaH₂PO₄ 100mM, pH 8,0, Tris 10mM e Gu-HCl 6M), de modo a solubilizar as proteínas da fração insolúvel.

Após nova sonicação nas condições descritas acima, e centrifugação, o sobrenadante, contendo as proteínas solubilizadas, foi incubado na proporção 4:1 (v/v) com resina Ni-NTA previamente equilibrada no tampão B, e homogeneizado por 1 h e 30 min, a temperatura ambiente. A coluna foi lavada com tampão C (NaH₂PO₄ 100mM, pH 6,3, Tris 10mM e Uréia 8M) e tampão D (NaH₂PO₄ 100mM, pH 5,9, Tris 10mM e Uréia 8M) por 10 min cada, para retirada das proteínas ligadas inespecificamente. Em seguida, foram realizadas duas eluições de 15 min cada com tampão E (NaH₂PO₄ 100mM, pH 4,5, Tris 10mM e Uréia 8M) e 2 eluições

(15 min cada) e 1 eluição de 1 h com tampão F (NaH_2PO_4 , 100mM pH 4,0, Tris 10mM e Uréia 8M).

As amostras obtidas das lavagens e das eluições foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE 10% e a proteína purificada foi quantificada em espectrofotômetro a 595nm pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

Para a purificação da proteína recombinante a partir de células provenientes de 100 mL de cultura, foram realizadas duas lavagens adicionais de 10 min cada com o tampão C (pH 6,3) e mais duas lavagens de 15 min cada com o tampão de eluição F (pH 4,0), devido à maior quantidade de proteínas expressas presentes na fração insolúvel.

3.9 PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-gp43 Δ Nt EM COELHO

Um coelho macho jovem foi imunizado com gp43 Δ Nt recombinante purificada com o objetivo de avaliar a presença de epítomos em comum entre a proteína recombinante e nativa. Foram realizadas três doses de 75 μg de proteína recombinante purificada, por via subcutânea em 3 pontos próximos a região de linfonodos, com intervalo de 7 dias cada. A primeira dose foi preparada com adjuvante Completo de Freund (Sigma) (v/v) e as duas subseqüentes com adjuvante Incompleto de Freund (Sigma) (v/v). Foram coletadas amostras antes da primeira imunização (soro pré-imune), uma semana após cada dose e na segunda semana após a última dose por punção cardíaca, em condições estéreis.

A produção de anticorpos foi avaliada por ELISA indireto e a reatividade do soro foi avaliada por Imunodifusão Radial Dupla (IDRD) e *Western blot* utilizando-se exoantígeno de *P. brasiliensis*.

3.10 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GP43 Δ NT POR COELHO IMUNIZADO COM PROTEÍNA RECOMBINANTE E ANÁLISE DA REATIVIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR ELISA INDIRETO

Placas de poliestireno de fundo chato foram sensibilizadas com 5 μg /mL de gp43 Δ Nt recombinante em tampão carbonato 0,1M, pH 9,6, por 18 h, a 4°C. Após três lavagens com PBS-tween 0,05%, as placas foram bloqueadas com PBS-leite desnatado 5% por uma hora a 25°C. As placas foram lavadas com PBS-

tween 0,05% e em seguida foram acrescentados 100 µL dos soros coletados da imunização diluídos 1:100 em PBS-leite desnatado 1%, por uma hora a 25°C. Após lavagens com PBS-tween 0,05%, foi adicionado 100 µL de conjugado anti-IgG coelho-peroxidase (Sigma) à diluição 1:8.000 em PBS-leite desnatado 1%, uma hora à 25°C. Realizaram-se lavagens com PBS-tween 0,05% e adicionou-se 100 µL de substrato cromógeno (TMBZ e H₂O₂), e após 15 min de incubação a reação foi bloqueada com 50 µL de ácido sulfúrico 4N. A leitura da D.O. foi realizada a 450nm em leitora de microplaca iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD).

Para avaliação da reatividade da proteína recombinante em relação aos soros humanos, as placas de ELISA foram sensibilizadas com 2,5µg/mL de gp43 nativa ou 5µg/mL de gp43ΔNt recombinante. Os soros foram testados à diluição 1:100 em PBS-leite desnatado 1% e o conjugado anti-IgG humano-peroxidase (Sigma) à diluição 1:60.000 em PBS-leite desnatado 1%.

Os soros testados com proteína recombinante foram previamente adsorvidos com cepa de *E. coli* BL21(DE3) sem o plasmídeo recombinante. Foram considerados positivas as amostras que apresentaram o dobro da D.O._{450nm} do controle negativo.

3.11 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE SORO DE COELHO IMUNIZADO COM PROTEÍNA RECOMBINANTE POR IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA (IDRD)

O teste de IDRD foi realizado conforme descrito por Camargo e colaboradores (1988). Previamente, lâminas de microscopia (75 X 25 mm) foram preparadas com 3,5 mL de agarose ultra pura (Invitrogen) 1% em tampão PBS 1X. Em seguida, foram realizados orifícios na agarose da seguinte forma: um orifício central e seis orifícios ao redor com distância de 6 mm entre eles e medindo 3 mm de diâmetro cada um. Os orifícios centrais foram preenchidos com 25 µL de exoantígeno de *P. brasiliensis* e as amostras de soro (25 µL) foram adicionadas aos orifícios periféricos.

O soro de coelho imunizado com gp43ΔNt foi analisado para avaliar a formação de linha de identidade com soro de paciente com PCM.

As lâminas foram incubadas 24 a 48 h em câmara úmida à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas e mantidas em solução salina 0,9% durante 48 h, com várias trocas neste período. Após secagem, as lâminas foram

coradas por 15 min em solução de Azul de Coomassie (metanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue (BIO-RAD) 0,1% (p/v)) e descoradas em solução metanol 30% (v/v) e ácido acético glacial 10% (v/v) até desaparecimento da coloração de fundo.

3.12 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DO SORO DE COELHO IMUNIZADO COM GP43 Δ NT E ANÁLISE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR *WESTERN BLOT*

Inicialmente, foi realizada eletroforese em gel SDS-PAGE 10% de exoantígeno de *P. brasiliensis*, a 100V em tampão Tris-glicina pH 8,8. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, em tampão de transferência (Tris 0,3%, Glicina 1,44%, Metanol 20%) a 30V, 4°C, *overnight*. Após transferência, a membrana foi bloqueada com PBS-leite desnatado 5% por uma hora, à 25°C. Seguiram-se 5 lavagens de 5 min cada com PBS-tween 0,05% e adição de soro de coelho diluído 1:100 em PBS-leite desnatado 1% por uma hora, à 25°C. Após lavagens com PBS-tween 0,05% (5 vezes de 5 min cada) foi acrescentado o conjugado anti-IgG coelho-peroxidase (Sigma) diluído à 1:4.000 em PBS-leite desnatado 1%. Após 1 h, a membrana foi lavada com PBS-tween 0,05% e a reação foi revelada com solução de DAB (3, 3'-Diaminobenzidina) por 15 min.

Como controle positivo do teste foi utilizado soro policlonal de coelho anti-gp43 nativa, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, Unifesp, SP.

Também foi realizado um teste de *Western blot* para avaliação da reatividade da gp43 Δ Nt em relação aos soros de pacientes com PCM. Previamente, células de 20 mL de cultura induzida com 0,5mM de IPTG foram lisadas com tampão de lise (Tris 0,1M, pH 7,0, EDTA 1mM, Lisozima 0,1mg/mL) e após vários ciclos de sonicação e centrifugação o *pellet* foi ressuscitado em tampão de amostra e submetido à eletroforese em gel SDS-PAGE 10%. Os soros foram testados à diluição de 1:100 em PBS-leite desnatado 1% e o conjugado anti-IgG humano-peroxidase (Sigma) à diluição 1:30.000 em PBS-leite desnatado 1%.

Como controle da reação foram utilizadas amostras soronegativas para PCM coletadas de alunos do laboratório e soros de pacientes negativo para PCM (negativa na IDR e com menor D.O._{450nm} em teste de ELISA indireto empregando-se gp43 nativa).

3.13 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR *DOT BLOT*

Tiras de membrana de nitrocelulose foram sensibilizadas com 2 μ L de gp43 nativa à uma concentração de 10 μ g/mL ou gp43 Δ Nt recombinante em várias concentrações (10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 40 μ g/mL e 80 μ g/mL) diluídos em tampão PBS 1X. Após secagem do antígeno, as tiras foram bloqueadas com PBS-leite desnatado 5% durante 1 h e lavadas 5 vezes com duração de 5 min cada com PBS-tween 0,05%. Os soros, previamente adsorvidos com cepa de BL21(DE3) sem o plasmídeo recombinante, foram incubados em seguida à diluição 1:100 em PBS-leite desnatado 1% por 1 ou 2 h. As tiras foram lavadas 5 vezes de 5 min cada com PBS-tween 0,05% e foi adicionado conjugado anti-IgG humano-peroxidase (Sigma) à diluição 1:30.000 em PBS-leite desnatado 1% por 1 h. Após lavagens com PBS-tween 0,05%, a reação foi revelada com solução de DAB (3, 3'-Diaminobenzidina) por 20 min.

Nos testes com soro de coelho imunizado com gp43 Δ Nt, o conjugado utilizado foi anti-IgG coelho-peroxidase (Sigma) diluído à 1:4.000 em PBS-leite desnatado 1%.

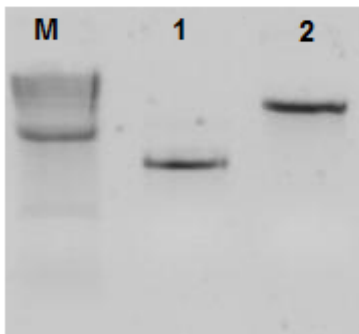
4 RESULTADOS

4.1 CLONAGEM DE gp43 TRUNCADA EM VETOR pETTEV

Inicialmente, foi proposta a produção de rgp43 truncada nas extremidades N-terminal e/ou na extremidade C-terminal (gp43 Δ Nt, gp43 Δ NtCt e gp43 Δ Ct respectivamente). Como foi possível obter apenas a construção gp43 Δ Nt em pETTEV, esta foi utilizada para seguimento dos estudos.

Previamente, o fragmento de gp43 clivada na região N-terminal foi construído e amplificado pela reação de PCR, gerando um produto em torno de 1,2 kb. O vetor pETTEV também foi preparado para ligação do fragmento através da digestão com as enzimas de restrição *NheI* e *EcoRI*. Ambos, inserto e vetor, foram analisados, após clivagem, por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados do gel (figura 4).

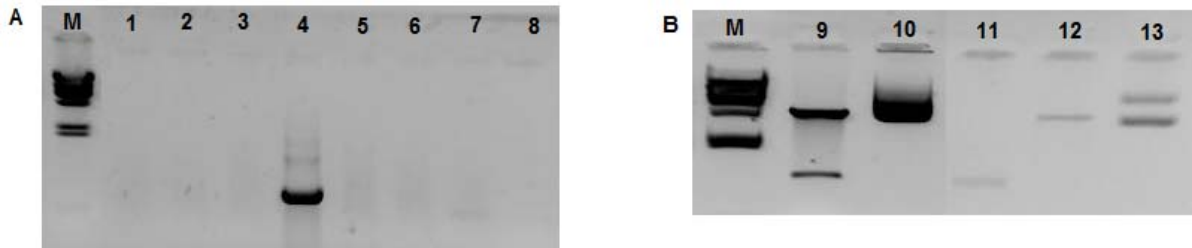
Figura 4 - Preparo do inserto gp43 Δ Nt e vetor pETTEV para clonagem.



gp43 Δ Nt (1) e vetor pETTEV (2) após clivagem com enzimas de restrição *NheI* e *EcoRI*. M. marcador λ DNA/*Hind* III Fragments (Invitrogen). 1. gp43 Δ Nt *NheI/EcoRI*. 2. vetor pETTEV clivado. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

Após obtenção dos clones transformantes, a clonagem do gene *gp43*, construção Δ Nt, no vetor pETTEV foi confirmada por PCR utilizando plasmídeo recombinante como *template* (figura 5A, linha 4) e pela clivagem do plasmídeo purificado (Plasmid Midi Kit, Qiagen) com as enzimas de restrição *NheI* e *EcoRI* que resultou na liberação de dois fragmentos com cerca de 1,2 kb e 5,4 kb correspondendo ao inserto e vetor respectivamente (figura 5B, linha 9).

Figura 5 - Amplificação do gene e clivagem para confirmação da clonagem de gp43ΔNt em pETTEV.



A) Amplificação do gene *gp43ΔNt*. 1-3 e 5-7: colônias negativas; 4- clone positivo apresentando uma banda de cerca de 1,2kb correspondente a *gp43ΔNt*; 8: controle negativo da reação de PCR. B) Digestão do plasmídeo recombinante positivo purificado com *NheI* e *EcoRI*; 9: produto da reação de digestão; 10: plasmídeo recombinante purificado; 11: *gp43ΔNt* clivado e purificado; 12: vetor pETTEV clivado; 13: Vetor pETTEV não digerido. M: marcador λ DNA/*Hind* III Fragments (Invitrogen). Análise por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

4.2 ANÁLISE DO CLONE *gp43ΔNt* EM pETTEV POR SEQUENCIAMENTO DE DNA

Após confirmação da clonagem por análise de restrição (Figura 5B, linha 9), o plasmídeo foi submetido a reação de sequenciamento para observação mais detalhada da sequência gênica e posicionamento no vetor de expressão. O sequenciamento do plasmídeo recombinante mostrou que o gene clonado foi inserido de forma correta no vetor e não foi detectada nenhuma mutação. O alinhamento e análise da sequência pelo programa BLASTn revelou 99% de identidade com a sequência AY005437 do banco de dados GenBank. A sequência, sua análise e posicionamento no vetor estão mostrados na figura 6.

Figura 6 - Sequência nucleotídica obtida através do sequenciamento do gene gp43ΔNt no vetor pETTEV e alinhamento com a sequência do banco de dados (GenBank AY005437).

GpΔNt/pETTEV,T7-F
 TRSGGTCTTCTCTAGAATATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGC CAT CAT CAT CAT CAT YAC
 RAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC CAT ATG GCT AGC GCA
 TCCGCATCATCTCAGTCGCATCTCACATTGTACCTCGTCAAGCAGGATCAGCAATATATGGTGTGAATATCGCGGGTG
 GCTATTGCTGGAGCCATGGATCTGSCCTCCGTCTCTGAAGCAGGGGGAGCAGCTCGTCCGATGAATACAACCTGAGCA
 AGAATCTCGGCAGAGATGCTAAAAGGCACCTTTGAAAACATTGGGACACCTTTATCACTGAAGATGATTTCAAGAACATT
 GCTGCGGCGGGTTAAACCATGT CAGGATCCGATCGGGTACTGGCAGTAAATCCTATAGAGGGAGAGCCATATGTACA
 AGGTCAACTCGACTATTTGGACAAGGCGCTTGTCTGGGCCAAAACCTCAAATCTGAGGGTCTCATCGATCTCCATGGTG
 TCCCGGGTTCCAAAAGCGCTTCGACAAACAGCGGTCAACGTTGGCGCATCAACTGGCAAAGGGTGACACGATCAAACAA
 ACCCTGATCGCCATCCATCTCTCGCAATCCGTACGCCAATCGTACCGACGTCGTGACTCCATAGAAATTGGTCAACAA
 ACCCTCCATACCAGGAGGCGTGCAGGTGTCCTACTGAAGGAATATTATGAGGATGGATATCACATCGTTCGTGATATAG
 ACAGCACCGTTGGCGTGCCAATTTCGGATGCTTCTCTGCCCGCGCACCTGGAATGGCTTTTGGCGCCAAAGACATAC
 AAGAACGCTACTCGACACATACCAACAACAAGTCTTCGATGATATCTTTAGGACCTTCACCATTGACCAGCACGTGAAG
 CTT

gb|AY005437.1| Paracoccidioides brasiliensis clone B339
 immunodominant antigen
 Gp43 (gp43) gene, complete cds
 Length=1329
 Score = 741 bits (401), Expect = 0.0
 Identities = 402/403 (99%), Gaps = 0/403 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query	1	GCATCCGCATCATCTCACGTCGCATCTCACATTGTACCTCGTCAAGCAGGATCAGCAATA	60
Sbjct	61	GCATCCGCATCATCTCACGTCGCATCTCACATTGTACCTCGTCAAGCAGGATCAGCAATA	120
Query	61	TATGGTGTGAATATCGCGGGTGGCTATTGCTGGAGCCATGGATCTCGCCCTCCGTCTTC	120
Sbjct	121	TATGGTGTGAATATCGCGGGTGGCTATTGCTGGAGCCATGGATCTCGCCCTCCGTCTTC	180
Query	121	GAGCAGGGCGGAGCAGCTCCGTGATGAATACACCCCTGAGCAAGAAATCTCGGCAGAGAT	180
Sbjct	181	GAGCAGGGCGGAGCAGCTCCGTGATGAATACACCCCTGAGCAAGAAATCTCGGCAGAGAT	240
Query	181	GCTAAAAGGCACCTTTGAAAACATTGGGACACCTTTATCACTGAAGATGATTTCAAGAAC	240
Sbjct	241	GCTAAAAGGCACCTTTGAAAACATTGGGACACCTTTATCACTGAAGATGATTTCAAGAAC	300
Query	241	ATTGCTGCGGGGGTTAAACCATGT CAGSATCCCGATCGGGTACTGGCAGTAAATCCT	300
Sbjct	301	ATTGCTGCGGGGGTTAAACCATGT CAGSATCCCGATCGGGTACTGGCAGTAAATCCT	360
Query	301	ATAGAGGGAGGCCATATGTACAAGGTCAACTCGACTATTGGACAAGGCGCTTGTCTGG	360
Sbjct	361	ATAGAGGGAGGCCATATGTACAAGGTCAACTCGACTATTGGACAAGGCGCTTGTCTGG	420
Query	361	GCCAAAACCTCAAATCTGAGGGTCTCATCGATCTCCATGGTG	403
Sbjct	421	GCCAAAACCTCAAATCTGAGGGTCTCATCGATCTCCATGGTG	463
Query	403	GTCCCGGGTTCCTAAAACGGCTTCGACAAACAGCGGTCAACGTTGGCGCCATCAACTGGCAA	462
Sbjct	541	GTCCCGGGTTCCTAAAACGGCTTCGACAAACAGCGGTCAACGTTGGCGCCATCAACTGGCAA	600
Query	463	AAGGGTGACACGATCAAACAACCCCTGATCGCCATCCATCTCTCGCAATCCGTTACGCC	522
Sbjct	601	AAGGGTGACACGATCAAACAACCCCTGATCGCCATCCATCTCTCGCAATCCGTTACGCC	660
Query	523	AATCGTACCAGCGTCTGACTCCATAGAAATGGTCAACAAACCCCTCCATACAGGAGGC	582
Sbjct	661	AATCGTACCAGCGTCTGACTCCATAGAAATGGTCAACAAACCCCTCCATACAGGAGGC	720
Query	583	GTGCAGGTGTCCTACTGAAGGAATATTATGAGGATGGATATCACATCGTTCGTGATATA	642
Sbjct	721	GTGCAGGTGTCCTACTGAAGGAATATTATGAGGATGGATATCACATCGTTCGTGATATA	780
Query	643	GACAGCACCGTGGCGTCCGCAATTCGGATGCTTCTCTGCCCGCGCACCTGGAATGGC	702
Sbjct	781	GACAGCACCGTGGCGTCCGCAATTCGGATGCTTCTCTGCCCGCGCACCTGGAATGGC	840
Query	703	TTTTGGCGCCCAAGACATACAAGAACGTCTAC-TCGACACATACCACAACCAAGTCTTC	761
Sbjct	841	TTTTGGCGCCCAAGACATACAAGAACGTCTACCTCGACACATACCACAACCAAGTCTTC	900
Query	762	GATGATATCTTTAGGACCTTCACCATTGACCAGCACGTGAAG	803
Sbjct	901	GATGATATCTTTAGGACCTTCACCATTGACCAGCACGTGAAG	942

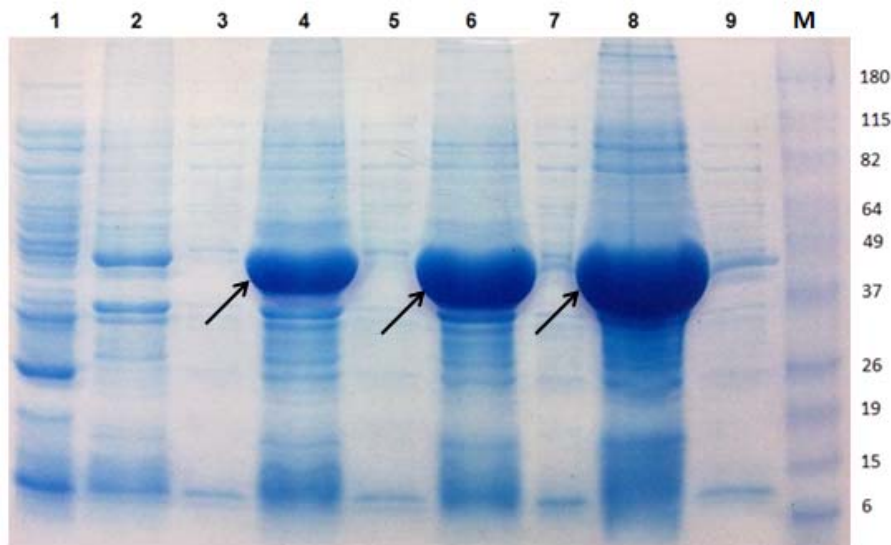
Sequência destacada em negrito e itálico: região codificadora de cauda 6XHis tag. Sequência destacada em vermelho: sítio para enzima de restrição *NheI*. Sequência sublinhada: nucleotídeos do gene *gp43ΔNt*. Y, S e *: correspondem a Citidina, Guanosina e Citidina, respectivamente (confirmados pelo cromatograma). A separação em trincas mostra o posicionamento correto do gene *gp43ΔNt* com o vetor pETTEV. O sequenciamento foi realizado com oligonucleotídeo que anela no promotor do plasmídeo pETTEV. Query: DNA sequenciado; Sbjct: sequências de banco de dados.

4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE gp43ΔNt

Uma vez confirmada a clonagem e analisado o sequenciamento, a construção plasmidial gp43ΔNt/pETTEV foi utilizada para transformar duas linhagens competentes de *E. coli* BL21, de modo a expressar a proteína.

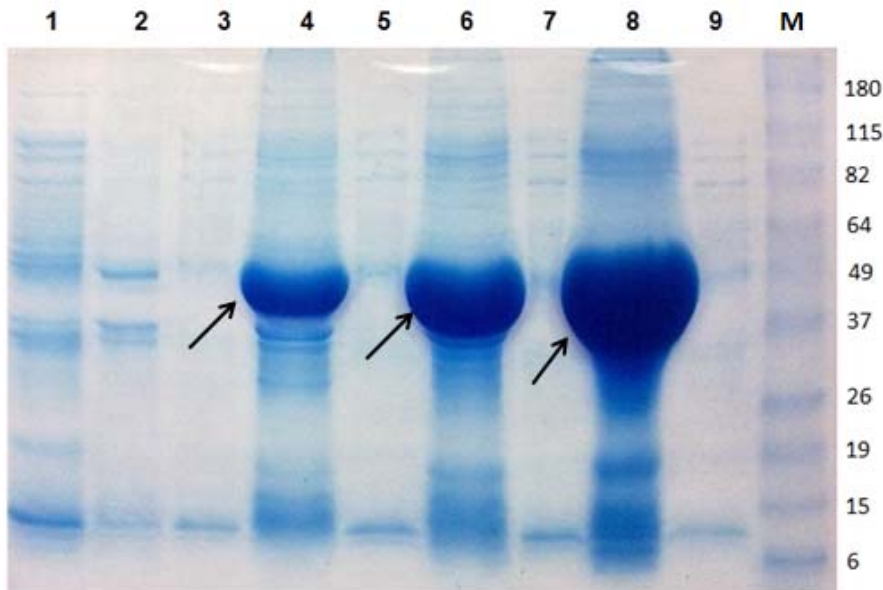
A produção da proteína recombinante gp43ΔNt em *E. coli* (BL21(DE3) e BL21 Rp) foi realizada através da indução por IPTG 0,5mM por 4 h à 37°C. Após centrifugação das alíquotas obtidas após indução, os extratos solúveis e os precipitados foram analisados por eletroforese em gel SDS-PAGE 10%. Podemos observar a presença da proteína recombinante somente no *pellet* da cultura, indicando que a proteína está na forma insolúvel (figuras 7 e 8, linhas 4, 6 e 8). Sendo assim, a purificação da proteína foi realizada sob condições desnaturantes.

Figura 7 - Análise de expressão e solubilidade da proteína recombinante gp43ΔNt em *E. coli* BL21 Rp.



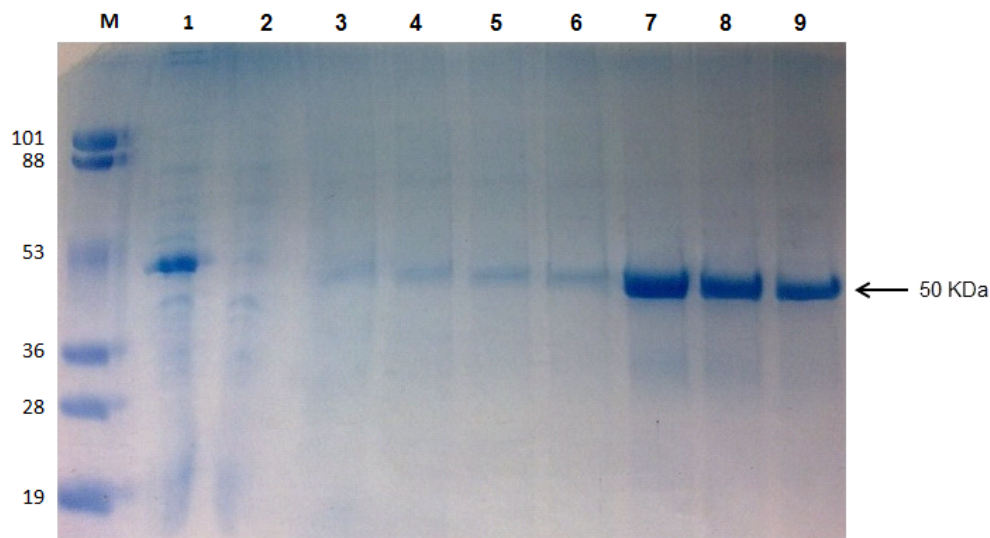
1 – extrato total de BL21 Rp, 2 – *pellet* da cultura antes da indução, 3 – sobrenadante da cultura antes da indução, 4 – *pellet* 1h após a indução, 5 – sobrenadante 1h após a indução, 6 - *pellet* 2h após a indução, 7 – sobrenadante 2h após a indução, 8 - *pellet* 4h após a indução, 9 – sobrenadante 4h após a indução, M – padrão de massa molecular, kDa (BenchMark™Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen). Eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, corado com Coomassie Brilliant Blue. A proteína gp43ΔNt está indicada por setas.

Figura 8 - Análise de expressão e solubilidade da proteína recombinante gp43ΔNt em *E. coli* BL21(DE3).



1 – extrato total de BL21(DE3), 2 – *pellet* da cultura antes da indução, 3 – sobrenadante da cultura antes da indução, 4 – *pellet* 1h após a indução, 5 – sobrenadante 1h após a indução, 6 - *pellet* 2h após a indução, 7 – sobrenadante 2h após a indução, 8 - *pellet* 4h após a indução, 9 – sobrenadante 4h após a indução, M – padrão de massa molecular, kDa (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen). Eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, corado com Coomassie Brilliant Blue. A proteína gp43ΔNt está indicada por setas.

A expressão da proteína recombinante foi maior em *E. coli* BL21 (DE3) (figura 8), e portanto esta foi utilizada nos testes subsequentes. Foi realizada uma purificação inicial a partir de células de 50 mL de cultura. A proteína apresentou massa aparente de 50 kDa e maior quantidade desta foi eluída no tampão F com pH 4,0 (figura 9, linhas 7, 8 e 9), resultando na obtenção de 1.197,8µg/mL da proteína recombinante gp43ΔNt. Para purificação partindo-se de células de 200 mL de cultura foi possível obter 8,1mg/mL de proteína, com um grau de pureza satisfatório.

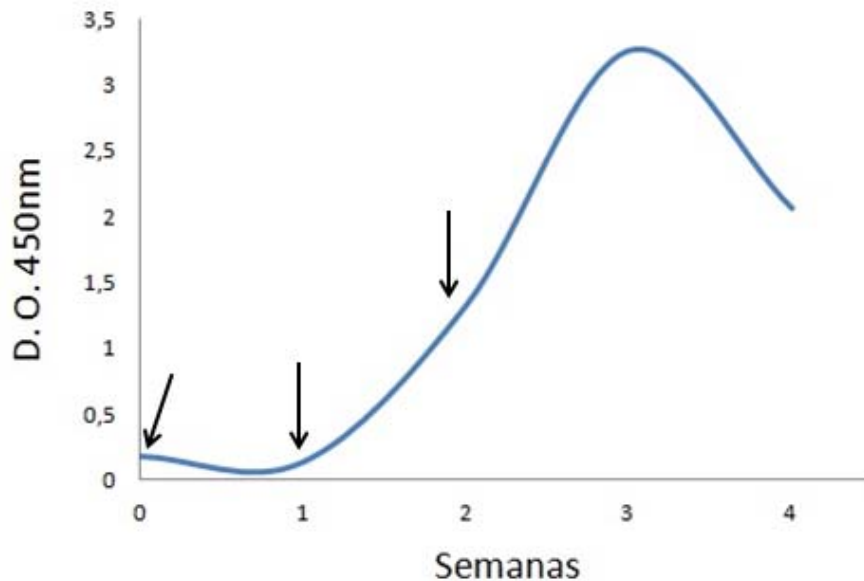
Figura 9 - Purificação da proteína recombinante gp43ΔNt.

M – Padrão de massa molecular, kDa, 1 – lisado celular contendo proteínas insolúveis após desnaturação, 2 – pós-coluna, 3 – Tampão C (pH 6,3), 4 – Tampão D (pH 5,9), 5 – 1ª eluição Tampão E (pH 4,5), 6 – 2ª eluição Tampão E (pH 4,5), 7 - 1ª eluição Tampão F (pH 4,0), 8 – 2ª eluição Tampão F (pH 4,0), 9 – 3ª eluição Tampão F (pH 4,0). A seta indica a banda correspondente a proteína gp43ΔNt (50 kDa). Eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, corado com Coomassie Brilliant Blue.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA gp43ΔNt

O coelho imunizado com a proteína recombinante gp43ΔNt apresentou resposta humoral e demonstrou um pico uma semana após a terceira dose (figura 10).

Figura 10 - Avaliação da resposta imune humoral de coelho imunizado com gp43 Δ Nt por ELISA indireto.

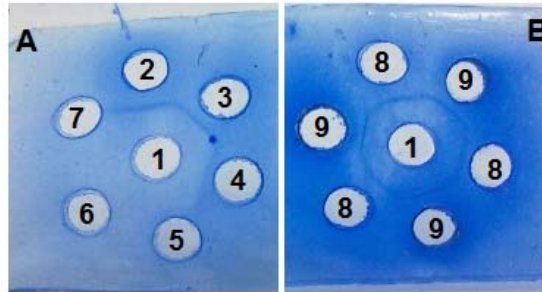


Foram realizadas três doses de proteína recombinante gp43 Δ Nt por via subcutânea. As amostras de soro foram coletadas antes da primeira imunização (soro pré-imune), uma semana após cada dose e na segunda semana após a terceira dose por punção cardíaca (as setas indicam as doses).

O soro com níveis mais altos de anticorpos foi avaliado pelos testes de IDR e *Western blot*. Na IDR observou-se reatividade do soro de coelho frente ao exoantígeno de *P. brasiliensis* até a diluição de 1:8 (figura 11A). A fusão das linhas de precipitação (figura 11B) demonstra que o exoantígeno é igualmente reconhecido pelo anticorpo de pacientes com PCM bem como pelo anticorpo de coelho anti-gp43 Δ Nt.

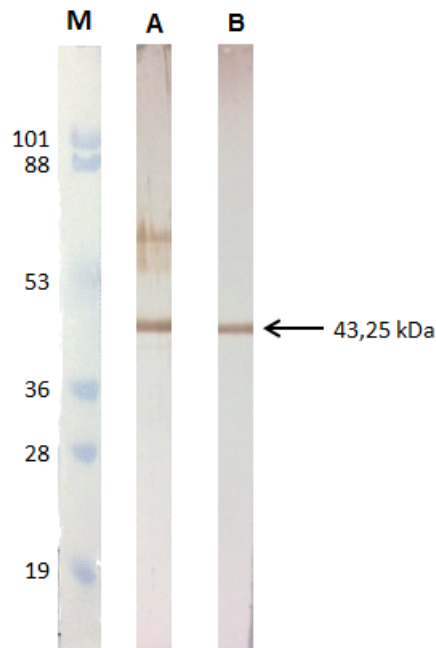
O soro de coelho anti-gp43 Δ Nt reconheceu a gp43 presente no exoantígeno de *P. brasiliensis* demonstrado pela visualização de uma banda com cerca de 43 kDa no *Western blot* (figura 12B). Esses resultados indicam que a proteína recombinante possui epítomos em comum com a gp43 nativa presente no exoantígeno de *P. brasiliensis*.

Figura 11 - Determinação do título de anticorpos anti-gp43 Δ Nt produzidos pelo coelho imunizado com proteína recombinante gp43 Δ Nt (A) e avaliação de identidade com soro de pacientes com PCM (B) por IDR com exoantígeno de *P. brasiliensis*.



1 – Exoantígeno de *P. brasiliensis*, 2 – Soro de coelho imunizado (SC) puro, 3- SC 1:2, 4- SC 1:4, 5- SC 1:8, 6- SC 1:16, 7- SC 1:32, 8- SC puro, 9- Soro de paciente com PCM.

Figura 12 - Avaliação da reatividade do soro anti-gp43 Δ Nt produzido por coelho imunizado com proteína recombinante gp43 Δ Nt por *Western blot* com exoantígeno de *P. brasiliensis*.



M – Padrão de massa molecular, kDa, A – Soro policlonal de coelho anti-gp43 nativa, B – Soro de coelho imunizado com gp43 Δ Nt. A seta indica a banda correspondente de gp43 nativa reconhecida pelos soros.

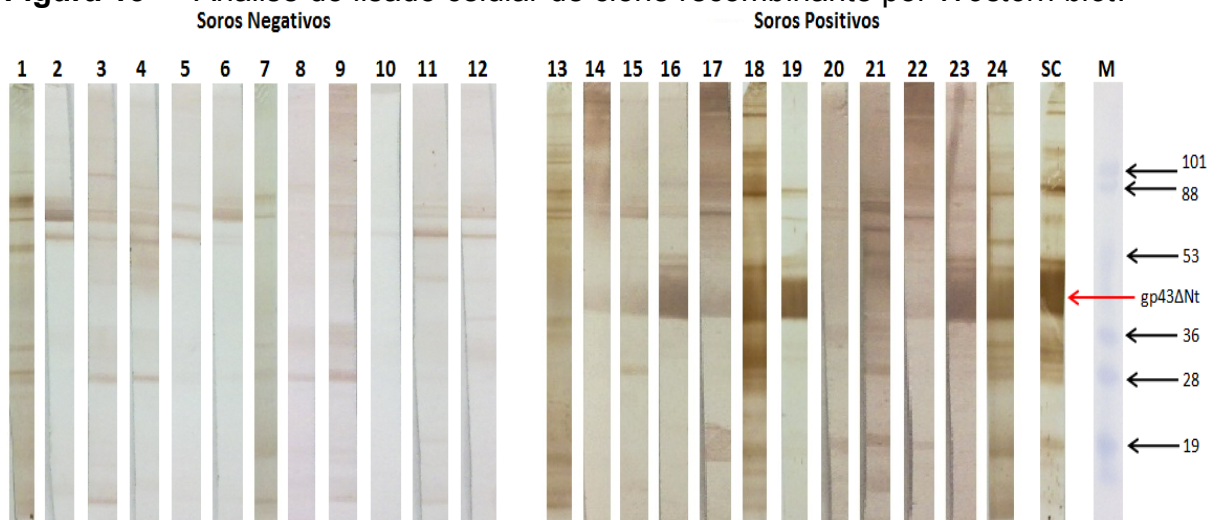
Todas as amostras de soro humano (77 amostras negativas e 12 positivas) foram avaliadas pelo método de ELISA indireto utilizando-se a proteína nativa, à concentração de 2,5 μ g/mL, e proteína recombinante diluída a 5 μ g/mL em tampão carbonato. Os resultados demonstraram que todos os soros positivos apresentaram alta reatividade com a proteína nativa e recombinante. Devido à sensibilidade do teste, 72 amostras apresentaram resultado positivo com gp43 nativa e 49 com gp43 Δ Nt.

O nível de correlação (r) entre as absorvâncias com gp43 nativa e gp43 Δ Nt foi igual a 0,768, indicando que alguns epítomos do antígeno nativo, que são reconhecidos pelos anticorpos, não estão presentes no antígeno recombinante ou estão inacessíveis devido à alteração na conformação da proteína insolúvel.

Para a avaliação da proteína recombinante pelos testes de *Western blot* e *dot blot*, foram utilizados os soros positivos de pacientes com PCM (12 amostras) e algumas amostras negativas (11 soros) que apresentaram baixas D.O._{450nm} no teste de ELISA com gp43 nativa e recombinante. No *Western blot* e *dot blot* também foram utilizados soro policlonal anti-gp43 de coelho e soro de coelho imunizado com gp43 Δ Nt respectivamente.

O teste de *Western blot* utilizando lisado celular de clone recombinante (figura 13) demonstrou que a gp43 Δ Nt foi bem reconhecida pelos soros de pacientes com PCM e pelo soro de coelho imunizado com gp43 nativa. Entre as amostras positivas testadas apenas 3 (amostras 13, 20 e 21) não reagiram com a proteína recombinante presente na fração insolúvel e em nenhuma amostra negativa foi detectada banda correspondente à gp43 Δ Nt.

Figura 13 - Análise do lisado celular de clone recombinante por *Western blot*.



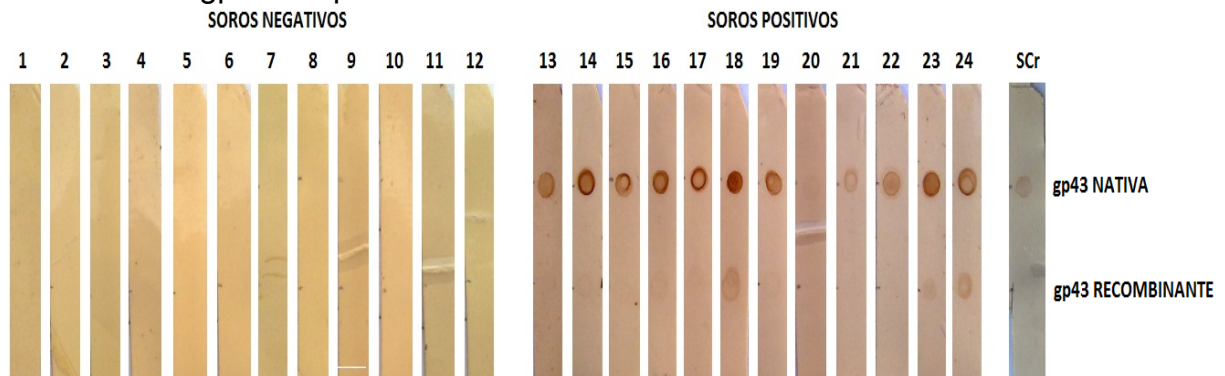
1 – Pool de soros de alunos e funcionários da UEL, 2 à 12 – Amostras de pacientes negativas para PCM nos testes de IDR e ELISA indireto, 13 à 24 – amostras de pacientes positivas para PCM, SC - soro de coelho imunizado com gp43 nativa, MM – Padrão de massa molecular, kDa. A seta vermelha indica a banda correspondente à gp43 Δ Nt recombinante.

Para avaliação da proteína recombinante pelo teste de *dot blot*, inicialmente, as tiras de nitrocelulose foram sensibilizadas com gp43 nativa e gp43 Δ Nt (10 μ g/mL) e os soros diluídos 1:100, foram incubados por 1 h. De acordo

com os resultados, nenhum soro negativo reagiu com as proteínas nativa ou recombinante e cinco soros de pacientes positivos (nº 14 à 17 e 19) apresentaram uma fraca reação com a gp43 Δ Nt, apesar da alta D.O._{450nm} detectada por ELISA com a proteína recombinante (figura 14). O soro de coelho imunizado, apesar de ter apresentado menor reação com a gp43 nativa, demonstrou a presença de epítomos em comum com a proteína gp43 Δ Nt.

Entre os soros positivos testados, quatro (amostras 13, 20 à 22) não reagiram com a proteína recombinante no *dot blot* e as amostras nº 13, 20 (proveniente do mesmo paciente, coletada em um intervalo de 8 meses) e 21 também não reconheceram a mesma proteína no *Western blot* (figura 13). As amostras citadas apresentaram resultados positivos no teste de ELISA com a proteína nativa e recombinante e reconheceram de forma significativa a proteína nativa no *dot blot*, exceto a amostra nº 20, a qual apresentou uma reação fracamente positiva.

Figura 14 - Análise do reconhecimento de gp43 nativa e recombinante por soros de pacientes e por soro de coelho imunizado com gp43 recombinante gp43 Δ Nt por *dot blot*.

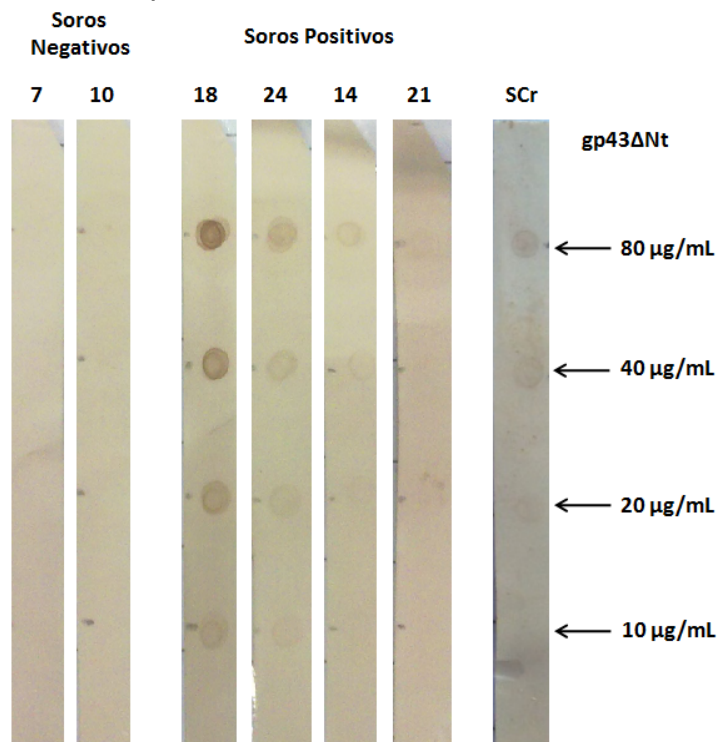


As proteínas nativa e recombinante foram testadas à concentração de 10µg/mL e os soros incubados por 1h. 1 – Pool de soros de alunos e funcionários da UEL, 2 à 12 – Amostras de pacientes negativas para PCM nos testes de IDRD e ELISA indireto, 13 à 24 – amostras de pacientes positivas para PCM, SCr – Soro de coelho imunizado com gp43 Δ Nt.

Alguns soros positivos, que não reconheceram a proteína recombinante na concentração de 10µg/mL (soro nº 21) ou que reconheceram fracamente (soro nº 14 e soro de coelho imunizado com gp43 Δ Nt), foram avaliados com concentrações crescentes de gp43 Δ Nt (10µg/mL, 20µg/mL, 40µg/mL e 80µg/mL). Apesar de ter sido observado reação um pouco mais forte ao aumentar a quantidade da proteína recombinante, não foi possível estabelecer uma concentração que distinguísse os soros positivos dos negativos, pois a amostra que

não reconheceu o antígeno recombinante à 10µg/mL demonstrou fraca reação com o antígeno ainda que em maiores concentrações. Os soros negativos não reconheceram a proteína recombinante em qualquer uma das concentrações utilizadas (figura 15).

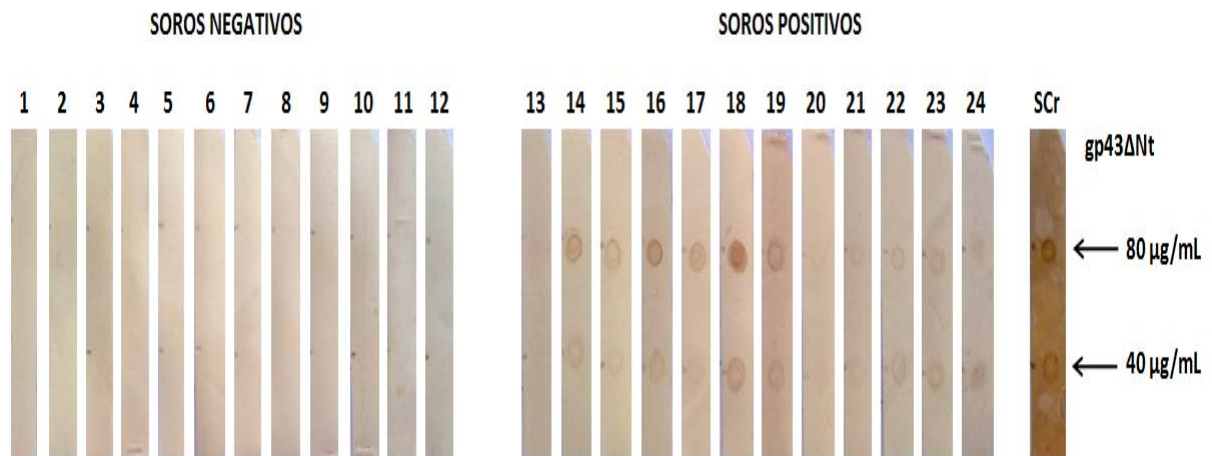
Figura 15 - Teste de reatividade de soros de pacientes e de soro de coelho imunizado com gp43ΔNt com diferentes concentrações de proteína recombinante por *dot blot*.



7 e 10 – Amostras de pacientes negativas para PCM nos testes de IDR e ELISA indireto, 18, 24, 14 e 21 – amostras de pacientes positivas para PCM, SCr – Soro de coelho imunizado com gp43ΔNt.

Com o objetivo de analisar as condições ideais para aplicabilidade da proteína recombinante no teste de *dot blot*, foram utilizadas gp43ΔNt à concentrações de 40µg/mL e 80µg/mL e o tempo de reação dos soros foi aumentado para 2 h. Todas as amostras positivas apresentaram reações mais nítidas com a proteína recombinante quando comparado aos resultados de *dot blot* anteriores (figuras 14 e 15), com exceção à amostra nº 13, que não reconheceu a proteína diluída à 40µg/mL. Os melhores resultados foram visualizados com gp43ΔNt em maior concentração e os soros negativos permaneceram não reconhecendo a proteína recombinante (figura 16).

Figura 16 - Análise de reatividade de soros de pacientes e de soro de coelho imunizado com gp43ΔNt por *dot blot*.



1 – Pool de soros de alunos e funcionários da UEL, 2 à 12 – Amostras de pacientes negativas para PCM nos testes de IDR e ELISA indireto, 13 à 24 – amostras de pacientes positivas para PCM, SCr – Soro de coelho imunizado com gp43ΔNt. Proteína recombinante gp43ΔNt em diferentes concentrações e tempo de incubação de 2 h.

Podemos observar também que as amostras nº 18 e 24 de um paciente com PCM aguda, coletadas antes e após 6 meses do início do tratamento, apresentaram redução nos níveis de anticorpos anti-gp43 demonstrada pelos métodos de ELISA indireto com a proteína nativa e recombinante, *Western blot* com lisado celular de clone recombinante e *dot blot* com gp43 nativa e gp43ΔNt nas concentrações de 40 e 80µg/mL, corroborando com os resultados de IDR com exoantígeno de *P. brasiliensis*.

O quadro 1 abaixo demonstra um resumo dos resultados dos soros positivos e negativos avaliados pelos testes de ELISA indireto, *Western blot* e *dot blot* descritos anteriormente. Os resultados do ELISA indireto foram calculados empregando-se como valor de corte o dobro da D.O._{450nm} do *pool* de soros negativos. No *Western blot* e *dot blot*, os resultados foram classificados visualmente de acordo com a magnitude das reações apresentadas, aplicando-se (+) para os resultados mais discretos e (+++++) para as reações mais intensas.

Quadro 1 - Quadro comparativo dos resultados obtidos pelos métodos de ELISA indireto, *Western blot* e *dot blot*.

Amostras	ELISA gp43 nativa 2,5µg/mL	ELISA gp43ΔNt 5µg/mL	<i>Western Blot</i> lisado celular contendo gp43ΔNt recombinante	<i>Dot blot</i>			
				gp43 Nativa 10µg/mL	gp43ΔNt 10µg/mL	gp43ΔNt 40µg/mL (soro 2h)	gp43ΔNt 80µg/mL (soro 2h)
NEGATIVAS	1	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	2	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	3	POSITIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	4	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	5	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	6	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	7	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	8	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	9	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	10	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	11	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
	12	POSITIVO	NEGATIVO	-	-	-	-
POSITIVAS	13	POSITIVO	POSITIVO	-	++++	-	-
	14	POSITIVO	POSITIVO	+++	+++++	+	+++
	15	POSITIVO	POSITIVO	+++	+++++	+	+++
	16	POSITIVO	POSITIVO	+++++	+++++	+	+++
	17	POSITIVO	POSITIVO	+++	+++++	+	++
	18	POSITIVO	POSITIVO	+++++	+++++	+++	++++
	19	POSITIVO	POSITIVO	++++	+++++	+	+++
	20	POSITIVO	POSITIVO	-	+	-	++
	21	POSITIVO	POSITIVO	-	+++	-	++
	22	POSITIVO	POSITIVO	+++	++++	-	+++
	23	POSITIVO	POSITIVO	+++++	+++++	++	+++
	24	POSITIVO	POSITIVO	++++	++++	+++	+++
SCr	POSITIVO	POSITIVO	NR	+++	+	+++	++++

1 – Pool de soros de alunos e funcionários da UEL, 2 à 12 – Amostras de pacientes negativas para PCM nos testes de IDR e ELISA indireto, 13 à 24 – amostras de pacientes positivas para PCM, SCr – Soro de coelho imunizado com gp43ΔNt. A intensidade das reações foi classificada em (+) à (+++++) para as amostras com resultados positivos e (-) para as amostras que apresentaram resultado negativo. NR – teste não realizado.

5 DISCUSSÃO

A glicoproteína de 43 kDa (gp43) é o antígeno de *P. brasiliensis* mais utilizado em testes sorológicos para o diagnóstico e estudo epidemiológico da PCM (Puccia et al., 1986; Costa et al., 2010; Oliveira et al., 2011). Embora a gp43 seja o antígeno específico para PCM, pode apresentar reatividade cruzada com antígenos de outros patógenos devido à porção carboidrato (Puccia e Travassos, 1991).

Dessa forma, a produção de gp43 por meio da tecnologia do DNA recombinante permite a produção da proteína em larga escala em sistemas heterólogos, facilitando o processo de padronização bem como a redução da reatividade cruzada em ensaios sorológicos, uma vez que proteínas recombinantes expressas em bactérias não são glicosiladas (Diniz et al., 2002).

Inicialmente neste trabalho, foi proposta a produção de três tipos de construções de gp43 retirando-se 20 aminoácidos das regiões N-terminal e/ou C-terminal na tentativa de obtê-la na forma solúvel, porém só alcançamos sucesso na produção de gp43 recombinante com deleção na extremidade N-terminal (gp43 Δ Nt). O gene truncado na região N-terminal da gp43 foi clonado em vetor pETTEV e a proteína foi produzida na forma insolúvel por *E. coli* BL21 Rp e *E. coli* BL21(DE3), demonstrando a dificuldade em obter proteínas solúveis em *E. coli* (Yokoyama, 2003; Gasser et al., 2008).

A cepa *E. coli* BL21(DE3) apresentou maior expressão da proteína recombinante, sendo utilizada nas etapas subsequentes de purificação e caracterização da proteína. A gp43 Δ Nt apresentou massa molecular de aproximadamente 50 kDa pois possui alguns aminoácidos do vetor fusionados a proteína clonada.

A proteína gp43 Δ Nt foi avaliada quanto à similaridade com a gp43 nativa. Os testes de IDRD e *Western blot* revelaram que os anticorpos produzidos pelo coelho imunizado com a proteína recombinante reconheceram a gp43 nativa presente no exoantígeno de *P. brasiliensis*, indicando a presença de epítomos em comum entre os antígenos nativo e recombinante. A similaridade entre a proteína nativa e recombinante também foi confirmada pelo *Western blot* utilizando-se lisado celular de clone recombinante, no qual o soro de coelho imunizado com gp43 nativa reconheceu a proteína gp43 Δ Nt presente no lisado celular.

Vários trabalhos descreveram a produção e caracterização de gp43 recombinante com o objetivo de otimizar a produção de antígenos mais sensíveis e específicos para o imunodiagnóstico da PCM (Cisalpino et al., 1996; Diniz et al., 2002; Carvalho et al., 2008). A proteína gp43 recombinante na forma solúvel só foi possível quando clonada em *P. pastoris*, porém apresentava a porção carboidrato que precisou ser retirada para eliminar reações cruzadas (Carvalho et al., 2008).

Cisalpino e colaboradores (1996) clonaram determinadas porções da gp43 em *E. coli* e analisaram a reatividade das proteínas obtidas utilizando-se soros de pacientes diagnosticados com PCM. A região interna da molécula, correspondendo aos aminoácidos 110 a 272, e a região C-terminal, composta pelos aminoácidos 288 a 411, reagiram fortemente com os soros no teste de *immunoblot*. Essas regiões não foram retiradas da proteína recombinante gp43 Δ Nt obtida neste trabalho.

Diniz e colaboradores (2002) clonaram o gene da gp43 em *E. coli* e avaliaram a reatividade da molécula processada (com deleção de 35 aminoácidos na região N-terminal) e de fragmentos da proteína recombinante (região N-terminal, sequência interna da proteína e região C-terminal) com soros de pacientes com PCM. Neste estudo foi verificado que a gp43 na forma processada foi reconhecida por todos os soros analisados e a maioria das amostras reagiu com a porção C-terminal. Também foi sugerido que as regiões mais antigênicas estão localizadas entre os aminoácidos 222 e 228, 259 e 264 (encontrados na parte interna da molécula) e principalmente entre os aminoácidos 356 e 364, presente na região C-terminal. Essas regiões foram mantidas na proteína gp43 Δ Nt descrita neste estudo.

Inicialmente, a proteína recombinante gp43 Δ Nt purificada foi avaliada por meio do método de ELISA indireto com o objetivo de verificar se os anticorpos presentes nos soros de pacientes com PCM, reconheceriam a proteína obtida. O coeficiente de correlação ($r = 0,768$) entre as absorvâncias com gp43 nativa e recombinante demonstrou que a proteína nativa apresenta alguns epítomos que estão ausentes no antígeno recombinante ou estão inacessíveis aos anticorpos devido à conformação da gp43 Δ Nt insolúvel, após purificação em condições desnaturantes.

Todos os soros positivos demonstraram alta reatividade com o antígeno nativo e recombinante pelo teste de ELISA indireto, porém, por ser um método com elevada sensibilidade, foi observada reação positiva em soros

considerados negativos pela IDR. As amostras negativas que reagiram com gp43 nativa e recombinante no ELISA eram provenientes de pacientes que haviam sido tratados para PCM e portanto ainda apresentavam anticorpos anti-gp43 em concentrações que não foram detectadas pela IDR.

Puccia e Travassos (1991) observaram que os soros de pacientes com PCM reconhecem preferencialmente a região peptídica da gp43 e que alterações na estrutura da proteína eliminam a reatividade com soros positivos, indicando que os anticorpos específicos à gp43 reconhecem predominantemente epítomos conformacionais do antígeno. A deglicosilação da proteína, insolubilidade, desnaturação para análise em SDS-PAGE e *blotting* podem modificar a conformação e influenciar no reconhecimento da proteína pelos anticorpos (Diniz et al., 2002).

A proteína obtida neste trabalho demonstrou bons resultados quando avaliada por *Western blot* utilizando lisado celular de clone recombinante. As amostras de pacientes com PCM que reconheceram de forma intensa a proteína apresentaram as maiores D.O. no ELISA com gp43 Δ Nt e com gp43 nativa. Não foi detectada reação utilizando-se soros de pacientes negativos para PCM e *pool* de soros de doadores saudáveis. Esses resultados sugerem que os anticorpos reconhecem regiões semelhantes entre a proteína nativa e recombinante.

No entanto, três amostras positivas (amostras nº 13, 20 e 21) não reagiram com o antígeno recombinante no *Western blot*. Provavelmente, os anticorpos presentes nessas amostras reconhecem epítomos conformacionais que não estão presentes na proteína recombinante ou perderam-se durante o preparo da amostra para eletroforese, pelo aquecimento e ação desnaturante do SDS presente no tampão de amostra.

A deleção da região N-terminal da gp43 não resultou na produção da proteína recombinante na forma solúvel. A expressão de proteínas recombinantes sob a forma de corpos de inclusão gera proteínas insolúveis, incapazes em atingir sua conformação nativa, diminuindo a reatividade com anticorpos específicos (Puccia e Travassos, 1991; Diniz et al., 2002; Yokoyama, 2003). A remoção dos 20 aminoácidos iniciais para produção da gp43 Δ Nt não retirou as regiões mais antigênicas conforme descrito anteriormente (Cisalpino et al., 1996; Diniz et al., 2002), porém, pode ter resultado em alteração na conformação da proteína e conseqüente perda de epítomos conformacionais.

O ensaio imunoenzimático por *dot blot* tem sido avaliado como alternativa para o diagnóstico da PCM humana e no monitoramento dos pacientes em tratamento. A gp43 nativa mostrou-se útil no sorodiagnóstico da PCM por *dot blot*, no entanto, foram observadas reações falso-positivas com outras micoses e com soros de doadores saudáveis. Após eliminação da porção carboidrato da gp43 através do tratamento com metaperiodato de sódio, obteve-se 100% de sensibilidade e especificidade (Taborda e Camargo, 1994).

Carvalho e colaboradores (2008) avaliaram a aplicabilidade de isoformas recombinantes de gp43 obtidas em *P. pastoris* pelo método de *dot blot*. Foi verificada reação cruzada com outras micoses, a qual foi eliminada após deglicosilação do antígeno ou quando os soros foram testados à diluição de 1:1.000. No presente trabalho, não foi detectada reação com a proteína gp43 Δ Nt em soros negativos nos testes de *Western blot* e *dot blot* pois esta não apresentava a porção carboidrato.

O *dot blot* é um método de simples execução, que não requer equipamentos para a leitura e fornece resultados mais rápidos (cerca de 3 h) em relação à IDRD, a qual necessita 48 h para obtenção de resultados (Taborda e Camargo, 1994). Portanto, optou-se por avaliar a utilização do antígeno recombinante produzido para o diagnóstico de PCM humana através da técnica de *dot blot*.

Quando avaliada por *dot blot* à diluição de 10 μ g/mL, a proteína recombinante não mostrou correlação com a gp43 nativa. Foi observado que as amostras que não reconheceram ou que apresentaram reação fracamente positiva com a proteína recombinante demonstraram forte reação com a gp43 nativa no mesmo método. Sendo assim, utilizando-se um teste que apresenta sensibilidade inferior em relação ao ELISA indireto, como o *dot blot*, ficou evidente a diferença entre o reconhecimento da proteína nativa e recombinante pelos soros positivos.

Aumentando-se a quantidade de proteína recombinante no *dot blot* observaram-se melhores resultados com os soros positivos. Além disso, os soros negativos não apresentaram reatividade mesmo utilizando-se a proteína em altas concentrações. No entanto, ainda não foi possível obter resultados que diferenciasse as amostras positivas das negativas com o antígeno recombinante.

Os melhores resultados utilizando-se a proteína recombinante no teste *dot blot* foram obtidos ao empregá-la à concentração de 80 μ g/mL e

aumentando o tempo de reação com o soro para 2 h. Nessas condições, 100% das amostras positivas reconheceram o antígeno recombinante e apresentaram reações semelhantes às obtidas com gp43 nativa. Portanto, é possível a utilização da gp43ΔNt no diagnóstico de PCM humana, uma vez que apresentou correlação com os resultados obtidos pela IDRD.

A IDRD é um método menos sensível, porém mais específico, amplamente utilizado no diagnóstico da PCM e monitoramento dos pacientes em tratamento. Na maioria dos casos, apresenta correlação entre título de anticorpos e remissão da doença, porém alguns pacientes com sintomas clínicos da doença podem apresentar baixa produção de anticorpos. Deste modo, é necessária a avaliação conjunta de aspectos clínicos, radiológico, micológico e sorológico na prática clínica para detecção de doença ativa ou cura do paciente (Camargo, 2008; Wanke e Aidê, 2009).

O tratamento eficaz do paciente com PCM é acompanhado de diminuição nos níveis de anticorpos circulantes anti-gp43 e pela restauração da imunidade celular (Mendes-Giannini et al., 1990; Diniz et al., 2002). Neste estudo, duas amostras (nº 18 e 24) coletadas de um paciente com PCM aguda em um intervalo de 6 meses, demonstraram redução na produção de anticorpos específicos anti-gp43 refletindo em diminuição da reatividade nos testes de ELISA indireto e *dot blot* com gp43 nativa e recombinante e no *Western blot* com lisado celular de clone recombinante. Semelhantemente, foi observada redução no título de anticorpos na IDRD, apresentando similaridade com os resultados de *dot blot* utilizando a proteína recombinante.

A proteína obtida não apresentava a porção carboidrato e estava na forma insolúvel, resultando em alteração em sua conformação e diminuição de epítomos acessíveis aos anticorpos. Sendo assim, justifica-se a necessidade de utilizá-la em maior concentração. Além disso, elevando o tempo de incubação com as amostras para 2 h aumentou a probabilidade dos anticorpos reagirem com o antígeno.

Neste estudo foi demonstrado que a proteína recombinante gp43ΔNt pode ser empregada no diagnóstico da PCM humana por *dot blot*. Os resultados apresentados foram semelhantes aos obtidos com gp43 nativa e demonstraram 100% de correlação com a IDRD em distinguir pacientes doentes de pacientes tratados.

6 CONCLUSÃO

Foi possível clonar e expressar a gp43 Δ Nt em *E. coli*, obtendo-se bom rendimento em sua purificação por coluna de afinidade em condições desnaturantes. Apesar de ter sido obtida na forma insolúvel, foi possível utilizá-la no imunodiagnóstico da PCM em humanos.

A proteína recombinante gp43 Δ Nt apresentou epítomos em comum com a gp43 nativa e foi reconhecida por soros de pacientes com PCM.

O método de *dot blot* com proteína recombinante gp43 Δ Nt mostrou-se útil no diagnóstico da PCM humana, apresentando correlação com os resultados obtidos por IDR, método de eleição para o diagnóstico desta micose.

REFERÊNCIAS

- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248-253, 1971.
- ALBUQUERQUE, C. F.; SILVA, S. H. M.; CAMARGO, Z. P. Improvement of the Specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1944-1946, 2005.
- BARNEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399-1408, 2004.
- BITTENCOURT, J. I. M.; OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1856-1864, 2005.
- BLOTTA, M. H. S. L. et al. Endemic Regions Of Paracoccidioidomycosis In Brazil: A Clinical And Epidemiologic Study Of 584 Cases In The Southeast Region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 3, p. 390-394, 1999.
- BLUMER, S. O.; JALBERT, M.; KAUFMAN, L. Rapid and realible method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 404-407, 1984.
- BORGES, I. K. *Imunodeteccção da Paracoccidioidomicose em cães com antígeno Gp43 recombinante (rGp43) de Paracoccidioides brasiliensis produzido em Escherichia coli*. 2011. 43 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.
- CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologist**, v. 165, p. 289-302, 2008.
- CAMARGO, Z. P. et al. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. **Medical Mycology**, v. 41, p. 539-542, 2003.
- CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 41-48, 2000.

- CAMARGO, Z. P. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 2147-2151, 1988.
- CARNEIRO, R. F. *Clonagem e expressão da proteína de levedura, TIP41, e levantamentos estruturais de sua ortóloga humana, TIPRL, por ressonância magnética nuclear unidimensional*. 2010. 33 f. 19º Programa de Bolsas de Verão – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Laboratório Nacional de Biociências, Campinas.
- CARRIÓ, M. M.; VILLAVERDE, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **Journal of Biotechnology**, v. 96, p. 3-12, 2002.
- CARVALHO, K. C. et al. Use of Recombinant gp43 Isoforms Expressed in *Pichia pastoris* for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 4, p. 622-629, 2008.
- CISALPINO, P. S. et al. Cloning, Characterization, and Epitope Expression of the Major Diagnostic Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4553-4560, 1996.
- CORNVIK, T. et al. An efficient and generic strategy for producing soluble human proteins and domains in *E. coli* by screening construct libraries. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, p. 266-273, 2006.
- COSTA, P. F. et al. Characteristics of environmental *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v. 169, p. 37-46, 2010.
- COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-1441, 2002.
- DEL NEGRO, G. M. B. et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 37-46, 2000.
- DINIZ, S. N. et al. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of the recombinant fusion proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1200-1204, 2002.
- Franco, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 5-18, 1986.
- FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycose. In: FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 7 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006. p. 1387.
- GASSER, B. et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 11, 2008.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

- LUTZ, A. Uma micose pseudo-coccidia localizada na boca e observada no Brasil: contribuição a conhecimento das hypho-blastomycoses americanas. **Brasil Médico**, v. 22, p. 141-144, 1908.
- MARTINEZ, R.; MOYA, M. J. Associação entre paracoccidioidomicose e Alcoolismo. **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 1, 1992.
- MCEWEN, J. G. et al. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of Medical Research**, n. 26, p. 305-306, 1995.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Antibody responses to 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 2, p. 200-206, 1990.
- MIDDELBERG, A. P. J. Preparative protein refolding. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 437-443, 2002.
- NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente em el suelo argentino. **Prensa Med. Argent.**, v. 53, p. 2831-2832, 1966.
- OLIVEIRA, G. G. et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. **Mycopathologia**, v. 171, p. 197-202, 2011.
- ONO, M. A. ET AL. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Medical Mycology**, v. 40, p. 493-499, 2002.
- PANIAGO, A. M. M. et al. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 455-459, 2003.
- Pan-American Health Organization (PAHO). Paracoccidioidomycosis. Proceedings of the first Pan-American Symposium in Medellin, Colombia, World Health Organization. **Chest**, v. 65, 1974.
- PETRONI, T. F. **Obtenção de gp43 de Paracoccidioides brasiliensis recombinante em Escherichia coli e produção de anticorpos policlonais para gp43 em galinhas poedeiras imunizadas com vacina de DNA**. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199-206, 1986.
- PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-Kilodalton Glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunochemical Reactions with Sera from Patients with Paracoccidioidomycosis, Histoplasmosis, or Jorge Lobo's Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 1610-1615, 1991.

QUAGLIATO, R. J. ET AL. Associação entre paracoccidioidomicose e tuberculose: realidade e erro diagnóstico. **Journal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 295-300, 2007.

RESTREPO, A. M. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; CANO, L. E.; OCHOA, M. T. A yeast-derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serologic testing. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 22, p. 23-29, 1984.

Santos, W. A.; Silva, B. M.; Passos, E. D.; Zandonade, E.; Falqueto, A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 245-253, 2003.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v. 165, p. 183-195, 2008.

SILVEIRA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v. 38, p. 193-199, 2000.

Shikanai-Yasuda M. A. et al. ; Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

Sorensen, H. P.; Mortensen, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, 2005.

TABA, M. R. M. ET AL. Expression in *Escherichia coli* of a gene coding for epitopes of a diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Experimental Mycology**, v. 13, p. 223-230, 1989.

TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by Dot Immunobinding Assay for Antibody Detection Using the Purified and Specific Antigen gp43. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 554-556, 1994.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 3, n. 11, 2004.

WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1245-1249, 2009.

YOKOYAMA, S. Protein expression systems for structural genomics and proteomics. **Current opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 39-43, 2003.