

TRIOSE FOSFATO ISOMERASE DE PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS: REATIVIDADE IMUNOLÓGICA, CITOLocalIZAÇÃO E ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE ADESINA

PEREIRA, Luiz Augusto¹; SOARES, Célia Maria de Almeida²

Palavras-chave: Triose Fosfato Isomerase, *Paracoccidioides brasiliensis*, adesina, reatividade imunológica, citolocalização

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica de alta prevalência no Brasil (Brummer et al. 1993). Este fungo apresenta dimorfismo térmico, crescendo a 25 °C sob a forma miceliana e a 37 °C sob a forma de leveduras. Estudos de Western blotting mostram que antígenos do fungo são reconhecidos por anticorpos presentes no soro de pacientes com PCM, entre eles uma proteína de 29 kDa que apresenta regiões de homologia com a enzima Triose Fosfato Isomerase (TPI) de outros microorganismos (Fonseca et al. 2001). Em nosso laboratório foram caracterizadas as seqüências genômica e de cDNA da *PbTPI*, tendo ainda sido realizada a expressão heteróloga e a purificação da proteína recombinante. Estudos de antigenicidade em etapas preliminares mostraram que a *PbTPIrec* é reconhecida por anticorpos presentes em soros de pacientes com PCM, semelhante à *PbTPI* nativa (Pereira et al. 2004). Com a produção de um anticorpo policlonal em coelho a partir da *PbTPIrec*, foi possível realizar ensaios de avaliação do provável comportamento de adesina desta proteína. A partir da observação destes dados pretendemos avaliar no presente trabalho o papel desta proteína na interação patógeno-hospedeiro, visando analisar sua localização celular, bem como seu papel na adesão do fungo às células do hospedeiro.

2. METODOLOGIA

2.1 – Produção do anticorpo policlonal anti- *PbTPIrec*.

A proteína recombinante purificada foi utilizada na imunização de animais experimentais (coelho), em três etapas, visando a produção de anticorpos policlonais contra a *PbTPIrec*. A obtenção dos anticorpos policlonais foi realizada em colaboração com o Profº Drº Jaime Martins de Santana do Laboratório Multidisciplinar de Doença de Chagas - UnB.

2.2 – Ligação da *PbTPI* a componentes de matriz extracelular (ECM)

A *PbTPI*rec foi fracionada por eletroforese e depois transferida para membrana de nitro-celulose. As membranas foram submetidas à incubação com diferentes constituintes de matriz extracelular, como fibronectina, laminina, colágeno tipo I e tipo IV, sendo reveladas posteriormente com anticorpos específicos para cada ECM e um anticorpo secundário acoplado a peroxidase.

2.3 – Ligação da *PbTPI*rec a culturas celulares

Foram utilizadas duas culturas celulares neste ensaio: células VERO® e de pneumócitos humanos A459. As células foram crescidas até formar uma monocamada e incubadas com a *PbTPI*rec, sendo posteriormente lisado o tapete celular. Após centrifugação do material, o sobrenadante foi utilizado em ensaio de Western blot com o anticorpo anti- *PbTPI*rec.

2.4 – Citolocalização da *PbTPI*

As amostras de células de *P. brasiliensis* foram preparadas e em seguida desidratadas como descrito por Boharaeem & Vishniac (1982). Após inclusão em LR-Gold, com a utilização de luz ultravioleta, os cortes ultra-finos foram coletados em grades de níquel. As amostras foram incubadas com o anticorpo primário anti-*PbTPI*rec e com o secundário marcado com ouro coloidal e posteriormente visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão. Esses estudos foram realizados em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão do Laboratório de Microscopia Eletrônica – UnB.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Western blotting com anti-*PbTPI*rec

Foram utilizados extratos celulares da fase miceliana e leveduriforme de *P. brasiliensis*, *Escherichia coli* XL1 blue transformada com vetor pGEX-TPI e *PbTPI*rec purificada no ensaio de Western blotting. O anticorpo policlonal anti- *PbTPI*rec reconheceu com um título ótimo de 1/1000 apenas uma banda de 29 kDa nos extratos de *P. brasiliensis*, referente à proteína nativa e uma banda de 56 kDa referente à proteína de fusão no extrato de *E. coli*, não apresentando reatividade cruzada com outras proteínas.

3.2 – Ligação a componentes de matriz extracelular e culturas celulares

A *PbTPI*rec apresentou capacidade de ligação aos componentes de matriz extracelular: laminina e fibronectina, segundo ensaio de Western blotting. No ensaio de ligação às culturas celulares tanto para células VERO como de pneumócitos foi observado a presença da *PbTPI*rec no sobrenadante do lisado celular.

3.3 – Citolocalização da *PbTPI*

Os cortes ultra-finos de células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram incubados em três sistemas, sendo o primeiro com o anticorpo primário anti-*PbTPI*rec e secundário acoplado a ouro

coloidal, o segundo com anticorpo primário referente ao soro pré-imune de coelho e secundário acoplado a ouro coloidal, e o terceiro somente com o secundário acoplado a ouro. As eletromicrografias evidenciaram a presença da *PbTPI* disposta na parede celular do fungo, bem como de maneira uniforme em todo o citoplasma.

4. CONCLUSÃO

Segundo os resultados observados em nosso trabalho, observamos que a proteína Triose Fosfato Isomerase de *P. brasiliensis* desempenha relevante papel na interação do fungo às células do hospedeiro durante o processo de infecção. Visto que apresenta capacidade de ligação a componentes de matriz extracelular, bem como à culturas celulares distintas, característica fundamental de algumas proteínas que se comportam como adesinas em processos de infecção de outros patógenos descritos na literatura. O reconhecimento desta proteína como componente antigênico, bem como características comuns à adesinas, e sua localização na parede celular do fungo mostra que provavelmente sua função vai além de uma simples enzima da via glicolítica, e que esteja envolvida no processo de patogênese do fungo, o que a torna um interessante alvo de estudo na infecção de *P. brasiliensis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boharaeen S, Vishniac HS 1982. A fixation method for visualization of yeast ultrastructure in the electron microscope. *Pathologia* 77: 19-22.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6: 89-117.
- Fonseca CA, Jesuíno RSA, Felipe MSS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 3: 535-542.
- Pereira LA, Pereira M, Felipe MSS, Zancopé-Oliveira RM, Soares CMA 2004. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the Triosephosphate Isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes infect* 6:892-900.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPQ/CAPES

¹ Bolsista de Doutorado. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTESP - Laboratório de Biologia Molecular, luaupe@gmail.com

² Orientadora/Instituto de Ciências Biológicas II /UFG, celia@icb.ufg.br