

IMUNOREATIVIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DO FUNGO PATOGENICO HUMANO *Paracoccidioides brasiliensis*.

SANTOS, R. S¹; BARBOSA, M. S¹; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M²; SOARES, C. M.A¹.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; reatividade imunológica.

1.INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo termodimórfico, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma das micoses humanas sistêmicas mais prevalentes da América Latina. O Brasil, Venezuela e Colômbia lideram os países onde a PCM vem sendo registrada com maior frequência. O fungo *P. brasiliensis* se desenvolve na fase leveduriforme e miceliana. A fase leveduriforme é encontrada no hospedeiro humano e em culturas *in vitro* em temperaturas entre 35 - 37°C. A fase miceliana é encontrada na natureza e seu cultivo *in vitro* é realizado entre 23 – 25°C. Técnica de eletroforese bidimensional e *western blotting* utilizando combinações de soros de pacientes com diferentes manifestações clínicas da PCM foram utilizadas na caracterização de novos determinantes antigênicos de *P. brasiliensis* (Fonseca et al., 2001). Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima chave da via glicolítica, desempenhando um papel crucial no catabolismo e anabolismo de carboidratos. Além da função enzimática, GAPDH tem sido descrita como antígeno em vários microrganismos patogênicos. Com o objetivo de se obter a proteína recombinante, o cDNA codificante para a GAPDH foi clonado no vetor de expressão TOPO-pET100 (Barbosa et al., 2004; Barbosa et al., 2005). A proteína recombinante foi utilizada em análises da reatividade imunológica através de *western blotting* utilizando-se soros de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico de PCM e soros de pacientes não portadores de PCM. Os resultados obtidos poderão contribuir, juntamente com outras moléculas para futuros testes de diagnóstico da PCM.

2. METODOLOGIA

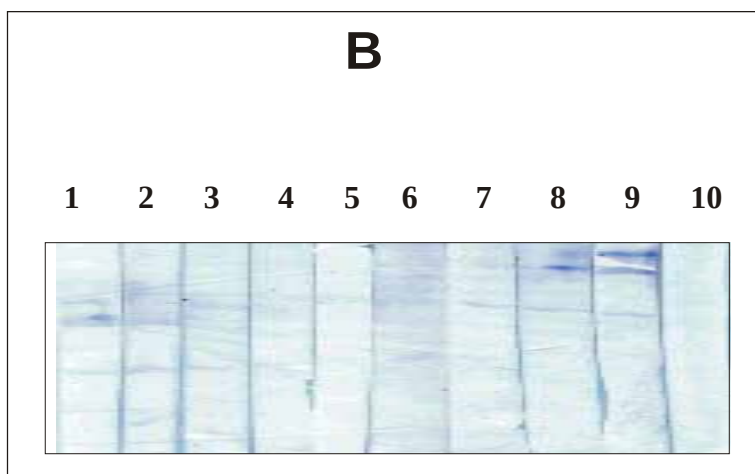
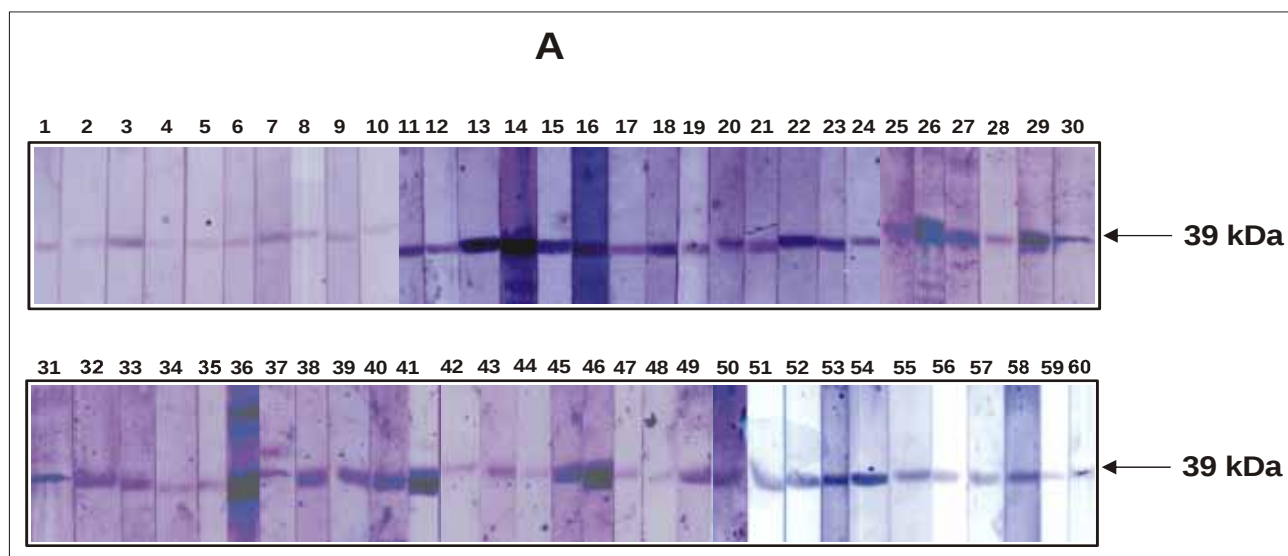
2.1 – ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS

A análise eletroforética das proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970). Logo após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose segundo o procedimento descrito por Sambrook et al., (1989).

2.2 – Western blotting

As proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com tampão de bloqueio [Leite desnatado 5%+ 0,1%Tween 20 diluído em solução de tampão fosfato (PBS- 0,14M NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH: 7,3)]. As proteínas foram reagidas com anticorpo primário (soros de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico de PCM ou soros de pacientes não portadores de PCM) na diluição de 1:500. A seguir procederam-se as lavagens em PBS1x + 0,1%Tween 20, e logo após as proteínas foram reagidas com o anticorpo secundário (anti-IgG humano acoplado a fosfatase alcalina) na diluição de 1:2000. Após a reação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas e incubadas com tampão de fosfatase alcalina por 15 minutos. A revelação foi realizada pela adição dos substratos: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e Azul de nitrotetrazolium (BCIP/NBT).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO



Figuras : Análise da reatividade imunológica da proteína *rPbGAPDH* através de *immunoblotting*. A proteína purificada (0,5 µg) foi fracionada através de eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose. **A-** A proteína recombinante *rPbGAPDH* foi reagida com soros de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico de PCM (diluição 1:500). **B-** A proteína recombinante foi reagida com soros de indivíduos controle (diluição 1:500). Após a reação com o anticorpo secundário anti-IgG humano acoplado a fosfatase alcalina (diluição 1:2000), a reação foi revelada com BCIP/NBT.

Os resultados de estudos prévios realizados, demonstraram que a GAPDH é uma proteína potencialmente antigênica. Dentre os soros de pacientes com PCM analisados 60 reagiram com a proteína *rPbGAPDH*, o que equivale a 100% de reatividade. Os soros de pacientes controles não portadores de PCM, num total de 10, não apresentaram reação significativa com a proteína recombinante (*rPbGAPDH*). Esses resultados reforçam o potencial papel da GAPDH como molécula antigênica na PCM. Testes sorológicos podem ser úteis para um rápido diagnóstico da PCM e se baseiam na detecção de resposta de anticorpos contra componentes do fungo. Dessa maneira, a detecção de anticorpos por antígenos recombinantes pode contribuir para aumento de especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade de testes diagnósticos.

4. CONCLUSÃO

A proteína recombinante *rPbGAPDH* foi reconhecida durante os ensaios sorológicos por soros de pacientes portadores de PCM, e não foi reconhecida pelos soros de pacientes controle. Assim *rPbGAPDH* poderá ser utilizada juntamente com outras proteínas imunoreativas do fungo *P. brasiliensis*, sendo testadas para incorporação de futuros imunodiagnósticos de PCM.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

C.A. Fonseca, R.S.A. Jesuino, M.S.S. Felipe, D.A. Cunha, W.A. Brito, C.M.A. Soares, Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Microbes Infect.* 3 (2001) 535-542.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

M.S. Barbosa, D.A. Cunha-Passos, M.S.S. Felipe, R.S.A. Jesuino, M. Pereira, C.M. Soares, The Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is differentially regulated phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: Molecular and phylogenetic analysis, *Fungal Genet. Biol.* 41 (2004) 667-675.

M. S. Barbosa, S. N. Bão, P. F. Andreotti, F. P. Faria, M. S. S. Felipe, L. S. Feitosa, J. S. Mendes-Giannini, C. M. A. Soares, The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein, related to fungus adhesion to extracellular matrix proteins and to the interaction with pneumocytes cells, *Infection in Immunit.* 2006.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N. Y., 1989.

FONTE DE FINANCIAMENTO – FUNAPE-UFG; CAPES ; CNPq.

¹ Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

² Laboratório de Micologia Médica do Hospital Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz – RJ.

Contatos com o autor: rdssantos@gmail.com