

Obtenção e caracterização dos antígenos Dopa decarboxilase e Transportador de zinco do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* utilizando a técnica de IVIAT (*In Vivo* Induced Antigen Technology)

Moreira, Sabrina Fonseca Ingênilo¹; REZENDE, Tereza Cristina²; COSTA, Milce³; BAILÃO, Alexandre Melo⁴; PEREIRA, Maristela⁵; SOARES, Celia Maria Almeida⁶.
Universidade Federal de Goiás – UFG – Instituto de Ciências Biológicas II –Goiânia – GO – Brasil. sabrinamoreira2003@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, antígenos, dopa decarboxilase, transportador de zinco.

I - INTRODUÇÃO

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.

A PCM é adquirida pela inalação de conídios do fungo, que atingem o epitélio dos alvéolos pulmonares e se convertem na forma leveduriforme, parasitária (McEwen *et al.*, 1987). Muitos indivíduos infectados desenvolvem somente a forma assintomática ou subclínica da micose. O progresso da patologia e a diversidade das formas clínicas dependem dos fatores imunológicos do hospedeiro (Franco, 1987) e dos diferentes níveis de virulência de isolados do fungo (San-Blas e Niño-Vega, 2001).

IVIAT (In vivo induced antigen technology) é a técnica que nos utilizamos neste trabalho para identificar antígenos expressos *in vivo* durante a infecção humana. IVIAT vem sendo usado em outros organismos com a finalidade de identificar ORFs (quadros de leitura abertos) que podem desempenhar algum papel de virulência ou patogenicidade (Handfield *et al.*, 2000; Deb *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Hang *et al.*, 2003).

2. METODOLOGIA

2.1 – Microrganismo e condições de cultivo

Estamos utilizando no presente trabalho o isolado *Pb01* (coleção ATCC-MYA-826). O fungo foi cultivado em meio Sabouraud na temperatura de 36 C durante 7 dias.

2.2 – .Soros de pacientes portadores de PCM e soros controle

Os soros foram coletados de pacientes com diferentes manifestações clínicas da PCM. Os soros controle foram obtidos de crianças com idade inferior a 10 anos, que não apresentavam sinais clínicos da doença e que não residiam na zona rural.

2.3 – Adsorção do soro

Foi feito um *pool* de soros de pacientes com PCM para adsorção por 1 hora a37°C com células de *P. brasiliensis* intactas e lisadas, assim como, células de *E. coli* lisadas.

2.4 – Biblioteca de cDNA

Foi utilizada uma biblioteca de cDNA da forma leveduriforme de *P. brasiliensis* clonada no vetor de expressão pSPORT 1 (GIBCO™ Invitrogen Corporation). Os RNAs utilizados na construção desta biblioteca foram obtidos de células de *P. brasiliensis* cultivadas *in vitro* por 7 dias, após isolamento de fígado de camundongos infectados.

2.5 – Rastreamento de proteínas expressas *in vivo* em *P. brasiliensis*

A biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* foi rastreada com soros adsorvidos de pacientes com PCM. Desta forma, vários possíveis antígenos foram rastreados e dois foram escolhidos para serem estudados com mais detalhe, a dopa decarboxilase e o transportador de zinco.

2.6 – Construção de oligonucleotídeos para clonagem em vetor de expressão

Foram construídos oligonucleotídeos com a finalidade de clonar os DNAs codificantes a dopa decarboxilase e o transportador de zinco no vetor de expressão pET 32a com a finalidade de obter as proteínas recombinantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nós identificamos vários clones positivos no rastreamento de uma biblioteca de cDNA de infecção de forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, dentre eles dois, dopa decarboxilase e transportador de zinco, serão estudados com mais detalhe. Os experimentos estão sendo realizados com o objetivo de obter as proteínas recombinantes e em seguida produção de anticorpo. DNAs codificantes a dopa decarboxilase e o transportador de zinco foram clonados no vetor de expressão pET 32a e serão purificados.

4. CONCLUSÕES

Os clones escolhidos para serem caracterizados neste trabalho ainda não possuem suas características de virulência e patogenicidade bem conhecidas em fungos dimórficos, por este motivo vamos estudá-los com mais detalhe. Nosso objetivo atual é investigar o papel dessas proteínas durante o processo infectivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEB, D. K., DAHIYA, P., SRIVASTAVA, K. K., SRIVASTAVA, R., SRIVASTAVA, B. S. 2002. Selective identification of new therapeutic targets of *Mycobacterium tuberculosis* by IVIAT approach. *Tubercul.* **82**:175-182

FRANCO, M. 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J.Med.Vet.Mycol.* **25**:5 -18

HANDFIELD, M., LEHOUX, D. E., SAMSCHAGRIN, F., MAHAN, M, J., WOODS, D. E., LEVESQUE, R. C. 2000. *In vivo*-Induced Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.* **68**:2359-2362

HANG, L., JOHN, M., ASADUZZAMAN, M., BRIDGES, E., A., VANDERSPURT, C., KIRN, T. J., TAYLOR, R. K., HILLMAN, J., D., PROGULSKE-FOX, A., HANDFIELD,

M., RYAN, E., T., CALDERWOOD, E. B. 2003. Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*. *PNAS*. **100**:8508-8513

KIM, Y. R., LEE, S. E., KIM, C. M., KIM, S. Y., SHIN, D. H., CHUNG, S. S., CHOY, H. E., PROGULSKE-FOX, A., HILLMAN, J. D., HANDFILED, M., RHEE, J. M. 2003. Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. *Infect.Immun* **71**: 5461-5471.

McEWEN, J. G., BEDOYA, V., PATINO, M. M. 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J.Med.Vet.Mycol.* **25**: 165-75

SAN-BLAS, G., NIÑO-VEGA, G. 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. *In*: Cihlar, R. L., Calderone, R. A., eds. *Fungal Pathogenesis: Principles and clinical applications*. New York:Marcel Dekker.pp.205-226

Apoio financeiro: MCT/CNPq.