

## CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DO PATÓGENO HUMANO *Paracoccidioides brasiliensis*

Rodrigo da Silva Santos<sup>1</sup>, Nathalie Martelli de Paula<sup>2</sup>, Mônica Santiago Barbosa<sup>3</sup>, Célia Maria de Almeida Soares<sup>4</sup>

### RESUMO

O *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina. Os propágulos da fase miceliana do fungo, quando inalados, diferenciam-se na forma de leveduras estabelecendo a infecção nos pulmões humanos. O estabelecimento da doença depende, dentre vários aspectos, da habilidade do fungo em modular a resposta do sistema imune. A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi caracterizada em laboratório, como uma proteína antigênica de *P. brasiliensis*. Em estudos prévios o cDNA codificante para a GAPDH de *P. brasiliensis*, foi subclonado no vetor de expressão TOPO pET100, para obter-se a proteína recombinante de fusão. A proteína foi super-expressa em *Escherichia coli* para produzir altos níveis da proteína recombinante, que foi purificada por cromatografia de afinidade. Por essa razão, este trabalho objetivou utilizar a proteína recombinante em estudos de reatividade imunológica com soros de pacientes portadores de PCM. Para tanto, utilizou-se de uma pesquisa de abordagem molecular, sendo que um total de 70 amostras de soros de pacientes foi analisado, através de Western blotting, quanto à reatividade com a proteína recombinante purificada GAPDH (rGAPDH). Os ensaios de Immunoblotting indicaram que a rGAPDH foi capaz de reagir com anticorpos presentes em soros de pacientes portadores de PCM, mas não com soros de pacientes controle. A rGAPDH poderá ser adicionada ao pequeno arsenal de moléculas imunoreativas de *P. brasiliensis*, sendo testada para incorporação em ensaios para sorodiagnóstico da doença.

**Palavras-chave:** infecções fúngicas; reatividade imunológica; diagnóstico molecular.

### IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE RECOMBINANT PROTEIN OF *Paracoccidioides brasiliensis* HUMAN PATHOGEN.

#### ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* is the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a main medical problem in Latin America. When inhaled, the fungus mycelia propagules differentiate into yeast phase, establishing the infection in human lungs. The disease establishment depends, among several aspects, on the ability of fungus to modulate the host immune system. The Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein has been characterized in laboratory as an immunogenic protein of *P. brasiliensis*. In previous studies the cDNA, that encodes the *P. brasiliensis* GAPDH, was subcloned into the expression vector TOPO pET100 to obtain the recombinant fusion protein. This protein was overexpressed in an *Escherichia coli* host to produce high levels of recombinant protein that was purified by affinity chromatography. In this study, the recombinant protein was evaluated regarding to its immunological reactivity with sera of PCM patients. Therefore, this research aimed to use the recombinant protein in studies of immune reactivity with sera from patients with PCM. For this purpose, a molecular approach was used in this research. The reactivity with purified recombinant GAPDH (rGAPDH) protein of 70 human sera samples were tested by *Western blot* analysis. Immunoblots indicated that rGAPDH was able to react with antibodies present in all sera of PCM patients, but not with sera of control patients. Thus, rGAPDH may be added to the small arsenal of immunoreactive molecules of *P. brasiliensis* and tested to its incorporation to disease serodiagnosis test.

**Keywords:** fungal infections; immunological reactivity; molecular diagnostics.

<sup>1</sup> Biólogo - Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Bioquímica e Imunologia e Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

<sup>2</sup> Bióloga - Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

<sup>3</sup> Biomédica - Professora Adjunta e Co-orientadora do Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

<sup>4</sup> Bióloga - Orientadora e coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular e Professora Titular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.



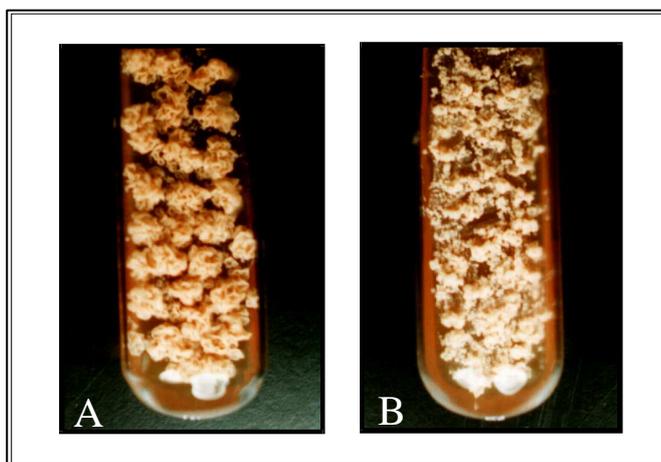
## INTRODUÇÃO

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico termo-regulado, patógeno humano e agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica geograficamente restrita a América Latina (1). O Brasil é responsável por 80% dos casos descritos na literatura, seguido pela Colômbia e Venezuela (2). Os estados brasileiros das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste são os locais onde a doença é mais frequentemente encontrada (3). Este fungo foi isolado pela primeira vez em 1908, por Adolpho Lutz (4), tendo sido observado nesta ocasião o aspecto dimórfico deste patógeno. A infecção do hospedeiro humano geralmente ocorre pela inalação de propágulos do fungo.

O fungo *P. brasiliensis* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos (5). Recentemente, Matute et al., (6) descreveram a existência de

três diferentes espécies de *P. brasiliensis*, denominadas S1 (espécie 1), PS2 (espécie filogenética 2) e PS3 (espécie filogenética 3). A espécie filogenética PS3 está geograficamente restrita à Colômbia, enquanto S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. Alguns isolados da espécie filogenética PS2 foram encontrados no Brasil nos estados de São Paulo e Minas Gerais e ainda na Venezuela.

O fungo cresce como levedura (Fig.1-A) nos tecidos infectados ou quando cultivado *in vitro* a 36°C. A forma miceliana (Fig.1-B), considerada infectiva, é observada em condições saprobióticas no meio ambiente, ou quando cultivada em temperaturas inferiores a 28°C (5). As células leveduriformes de *P. brasiliensis* são caracterizadas por apresentarem brotamentos múltiplos, formados pela evaginação da célula-mãe, onde uma célula central é circundada por várias células periféricas, conferindo um aspecto de roda de leme de navio. A forma miceliana pode ser identificada por filamentos septados com conídeos terminais ou intercalares (7).



**Figura 1:** Cultivo *in vitro* do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb 01 (ATCC, MYA 826). As células foram cultivadas em meio semi-sólido Fava Netto. **A)** Forma leveduriforme. **B)** Forma miceliana do fungo.

Fonte: (Foto cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular-UFG, Soares, CMA).

O habitat exato de *P. brasiliensis*, ainda não está bem definido. No entanto, algumas hipóteses são propostas. Acredita-se que o fungo viva na natureza, em ambientes de água fresca, tais como rios ou córregos. Outra hipótese propõe que o fungo viva

saprobicamente e de forma temporária no solo. Reforçando essa hipótese, o fungo foi isolado de duas espécies de tatus, o *Dasytus novemcinctus* e o *Cabassou centralis* (8).

A via inalatória é a principal porta de entrada do *P. brasiliensis* no hospedeiro humano. A pele e mucosas são também sítios de inoculação deste micro-organismo, através de implantação traumática e a transmissão inter-humana parece não ocorrer (9). A PCM atinge a pele, nódulos linfáticos e vários órgãos internos, incluindo os pulmões e o sistema nervoso central (10). O grau da patogênese varia de acordo com as características do hospedeiro e da linhagem infectante. A resposta imune do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* depende de fatores como idade, sexo, estado nutricional e herança genética. A PCM pode ser restrita ao trato respiratório ou pode disseminar-se pelo organismo, tornando-se letal (11). A doença tem, em geral, evolução crônica, caráter recidivante e pode deixar sequelas anatômicas e funcionais em humanos. É grande a quantidade de doentes que necessitam de assistência médica de longo prazo nas regiões de maior endemicidade, tornando a moléstia, pela sua prevalência, um importante problema de saúde pública (5).

Grupos de pesquisa da América Latina estão engajados em programas que visam o isolamento e caracterização de moléculas associadas à interação do fungo *P. brasiliensis* ao hospedeiro humano. Salem-Izacc et al., (12), clonaram, caracterizaram e expressaram o gene codificante para proteína mitocondrial HSP60 do fungo *P. brasiliensis*. Análises através de immunoblotting mostraram que, tanto a proteína recombinante quanto a nativa, são reconhecidas por anticorpos presentes no soro de pacientes com PCM. A proteína recombinante foi testada em ensaios de immunoblotting com soros de pacientes com PCM e outras micoses. Foram observadas 92,5% de especificidade e sensibilidade de 97,3 %, sugerindo ser a molécula um candidato a marcador sorológico na PCM (13). Costa et al. (14), caracterizaram a seqüência de um gene que codifica uma proteína imunoreativa de *P. brasiliensis*, que apresenta identidade com seqüências de manosiltransferases de outros fungos.

Técnicas de eletroforese bidimensional e Western blot foram utilizadas na caracterização de novos antígenos de *P. brasiliensis*. Fonseca et al. (15) identificaram determinantes antigênicos de *P. brasiliensis* utilizando combinações de soros de pacientes com diferentes manifestações clínicas da PCM. As proteínas reativas com soros foram

isoladas de géis bidimensionais e submetidas a sequenciamento dos peptídeos internos e da porção N-terminal. Os peptídeos seqüenciados apresentaram homologia com as seguintes proteínas: catalase (61-kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36-kDa), malato desidrogenase (34-kDa), frutose bifosfato aldolase (39-kDa) e triose fosfato isomerase (29-kDa). Os genes codificantes da catalase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e frutose bifosfato aldolase foram clonados e caracterizados (16,17,18). Os genes codificantes da triose fosfato isomerase e da formamidase foram clonados e as expressões heterólogas das proteínas recombinantes foram obtidas. Ensaios evidenciaram que a moléculas recombinantes são reativas a soros de pacientes com PCM (19,20).

O antígeno de *P. brasiliensis* melhor caracterizado é uma glicoproteína de 43 kDa, a gp43. Este componente exocelular foi isolado de filtrado de culturas leveduriformes. Em experimentos realizados, a gp43 foi fortemente reconhecida por soros (IgG) de pacientes portadores de PCM, através de ensaios de imunodifusão dupla e reações de imunoprecipitação (21,22,23). Uma proteína de 27 kDa, clonada em sistema heterólogo, foi submetida a ensaios imunológicos na PCM, demonstrando ser livre de reação cruzada significativa com soros de pacientes com outras micoses (24). Esta proteína de 27 kDa também foi utilizada de forma combinada com uma proteína de 87 kDa (classificada como uma proteína de choque térmico), no diagnóstico da PCM. Os dados obtidos em ensaios imunológicos revelaram um aumento significativo na utilizabilidade e na especificidade com a utilização das proteínas combinadas (25,26).

A paracoccidioidomicose tem sido amplamente estudada por grupos de pesquisa brasileiros, os quais têm elucidado algumas características próprias da doença, além de prover um maior conhecimento a respeito do genoma e dos mecanismos da infecção causada por este patógeno. Esses grupos de pesquisa vêm trabalhando na caracterização molecular de novos antígenos do fungo e suas importâncias na interação com o hospedeiro (16,17,18). Dentre os vários antígenos já caracterizados, podemos evidenciar a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que é objeto de estudo desse trabalho.



Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima chave da via glicolítica, desempenhando um papel crucial no catabolismo e anabolismo de carboidratos. Essa enzima é um homotetrâmero e catalisa a reação de oxidação da gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, usando o NAD<sup>+</sup> como coenzima (27). Atualmente as enzimas da glicólise de muitos organismos já foram cuidadosamente purificadas e estudadas, como por exemplo, a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *P. brasiliensis* (17).

GAPDH também é descrita como a principal proteína de superfície do grupo A de *Streptococcus pyogenes*, sendo relacionada com a virulência e patogênese. Assim como já relatado para *Candida albicans*, a GAPDH, de *S.pyogenes* se liga a várias proteínas de mamíferos como: lisozima, fibronectina, actina, miosina e plasmina. Essa proteína (GAPDH) também ativa a tirosina quinase de células faringiais humanas. O tratamento dessas células com inibidores de quinase inibe significativamente o poder de invasão deste patógeno no hospedeiro humano (28).

A habilidade de GAPDH de *C.albicans* de ligar-se às proteínas da matriz extracelular e consequentemente em estar associada ao estabelecimento da infecção tem sido descrita (29). A GAPDH foi também detectada na superfície celular de *C. albicans* presente em tecidos infectados, o que suporta a sugestão do papel da proteína na infecção, por ligação aos tecidos do hospedeiro. Crowwe et al. (30), analisaram o proteoma de *Candida albicans* e indicaram que a GAPDH é uma proteína de superfície celular potencialmente ligadora ao plasminogênio, o que adicionada a outros fatores, aumenta a capacidade desse fungo na invasão e necrose tecidual.

*Porphyromonas gingivalis fimbriae* e *Streptococcus oralis* são micro-organismos que possuem como característica a invasão de células epiteliais de revestimento da mucosa, causando infecções e inflamações na cavidade oral. Foi descrito que a GAPDH desses micro-organismos atua como receptor dominante da matriz extracelular, o que tem contribuído para a colonização desses micro-organismos no hospedeiro (31,32).

Além do seu papel no metabolismo de carboidratos e outras funções celulares como já citado, a enzima GAPDH tem sido descrita como antígeno em vários micro-organismos patogênicos, exercendo em alguns deles função protetora contra infecção em modelos experimentais (33). Tallima et al. (34), demonstraram o potencial papel da GAPDH de *Schistosoma mansoni* como molécula antigênica, sendo forte candidata na incorporação de vacinas contra esquistossomíase em humanos.

Estudos têm demonstrado o potencial imunogênico da GAPDH recombinante de *Brucella abortus* na manipulação de uma vacina para combater a Brucellose, patologia que acomete os bovinos. (35). A GAPDH recombinante de *Edwardsiella tarda*, enterobactéria isolada da água que causa patologias em reptéis, pássaros e todos os mamíferos, principalmente em humanos, tem sido utilizada em experimentos e se mostrado eficaz como vacina na prevenção e combate a Edwardsielose.(36).

O cDNA completo e uma sequência genômica codificante para GAPDH de *P.brasiliensis* foram clonados e caracterizados (17). Assim, por meio de experimentos de expressão heteróloga, obteve-se a proteína recombinante que foi purificada e utilizada em estudos funcionais e de interação, demonstrando ser a GAPDH, uma adesina crucial durante o desenvolvimento do processo infeccioso (37, 38).

O fungo *P.brasiliensis* possui uma complexa estrutura antigênica e apresenta, até o momento, uma biologia pouco conhecida. O emprego das técnicas de Biologia Molecular para o estudo deste fungo, embora recente, apresenta grande potencialidade trazendo novos conhecimentos no que se refere à taxonomia, aos fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade e colonização do fungo. Desta maneira tornou-se importante caracterizar a reatividade imunológica da proteína recombinante GAPDH de *P.brasiliensis* (rPbGAPDH), onde os novos resultados obtidos poderão contribuir, juntamente com outras moléculas para futuros testes de diagnóstico da PCM.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Micro-organismo e condições de crescimento

Foi utilizado o isolado 01 (coleção ATCCMYA-826) de *P. brasiliensis*, já caracterizado e padronizado em nosso laboratório. O fungo foi cultivado e mantido em meio de cultura Fava-Netto por 7 dias (39) a temperatura de 36°C para a forma leveduriforme e 14 dias, a 22°C, para a forma miceliana.

### Proteína recombinante

A proteína recombinante gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *P. brasiliensis* utilizada no estudo experimental foi produzida, conforme descrito por Barbosa et al. (37).

### Análise eletroforética

O fracionamento da proteína recombinante gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *P. brasiliensis* (37), através de eletroforese em gel de poli(acrilamida) foi realizado de acordo com Laemmli (40). As amostras protéicas foram homogeneizadas com tampão consistindo de 62,5 mM de Tris-HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] pH 6,8 com 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,5 M de ditiotreitol e 0,002% de azul de bromofenol. As proteínas foram dissolvidas por aquecimento durante 5 min. A separação foi efetuada em gel a 10% e em gel de empilhamento a 4% de acrilamida. O gel foi preparado a partir de uma solução estoque contendo 30% por peso de acrilamida e 0,8% por peso de bis-acrilamida. No gel de separação a polimerização foi feita em solução contendo 1,5 M de Tris-HCl, pH 8,8 e 0,4% de SDS, em presença de 0,1% v/v de N,N,N',N'-tetrametil-etilenediamina (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio. O gel de empilhamento foi polimerizado em presença de 0,5M de Tris-HCl pH 6,8 e 0,4% de SDS, além de 0,05% v/v de TEMED e 0,1% de persulfato de amônio.

A corrida eletroforética foi realizada a 80V até que o corante penetrasse no gel de separação e a 120V até que atingisse o fim do gel. O tampão de corrida é constituído de Tris 0,0075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH 8,3. Após a corrida eletroforética unidimensional, procedeu-se a transferência das proteínas do gel de poli(acrilamida) para a membrana de Nitrocelulose. Inicialmente, a membrana de

nitrocelulose Hybond-C (GE Healthcare), foi incubada por 5 minutos em água destilada para calibração e 15 minutos em tampão de transferência. Posteriormente, montou-se o sistema em “sanduíche” para transferência. Colocou-se então este sistema em cuba para eletroforese. A transferência ocorreu a 25 V, sob corrente constante, por 3 horas a 4°C. Após esse período a membrana foi corada com solução de vermelho Ponceau, para avaliação da eficiência da transferência, e descorada por lavagens com água destilada e em PBS 1X e PBS e Tween 20 a 0,05% (PBS-T). A membrana foi então incubada com tampão de bloqueio (leite desnatado a 5% e soro albumina bovina BSA 1% em PBS) por 3 horas a 4°C, onde foram imediatamente utilizadas em ensaios de Western blotting.

### Experimentos de Imunoreatividade

Os soros utilizados neste trabalho foram provenientes de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico (imunoprecipitação e imunofluorescência indireta) de PCM. Os soros foram gentilmente cedidos pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP - UFG (Unidade Gaspar Viana), pelo Laboratório de Micologia Médica da Fundação Oswaldo Cruz - RJ ou foram coletados em pacientes do HDT (Hospital de Doenças Tropicais), do HC (Hospital das Clínicas da UFG) e do Hospital Araújo Jorge, Goiânia - Goiás. Os soros de indivíduos controle foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Municipal de Análises Clínicas da cidade de Nerópolis – Goiás.

As membranas bloqueadas foram incubadas com os seguintes anticorpos: soros de 60 pacientes portadores de PCM e soros de 10 pacientes que não apresentavam diagnóstico de PCM (controle negativo). Os soros de pacientes com PCM, bem como os soros negativos, foram usados na diluição de 1: 500, para a reação com a proteína purificada, tendo sido a diluição determinada previamente. As membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora, sob agitação vigorosa ao abrigo da luz.

Após a incubação com o anticorpo primário, lavou-se as membranas em tampão de lavagem PBS 1X com Tween por três vezes de 15 minutos, sob agitação suave. As membranas foram então incubadas com Anticorpo secundário anti-IgG humano acoplado à fosfatase alcalina (Sigma Chemical Company®). Diluiu-se os anticorpos 1: 2000 em tampão de



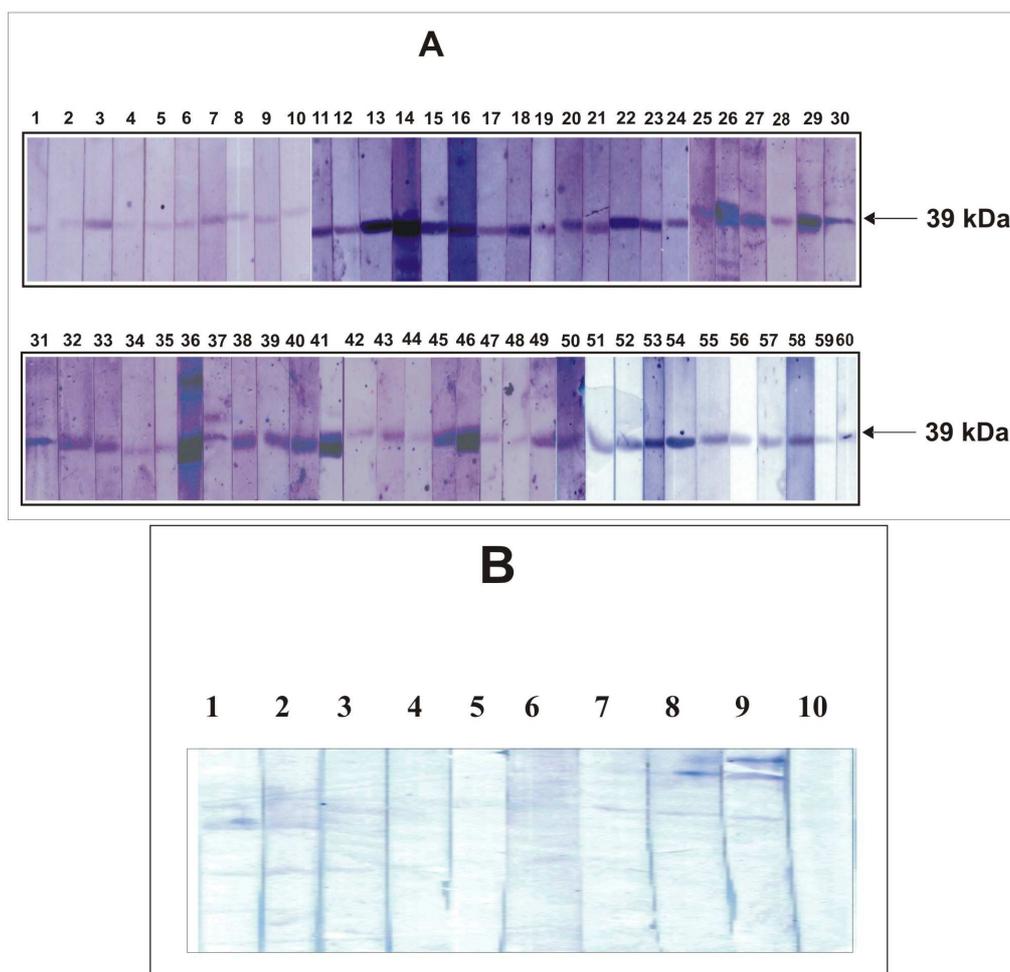
bloqueio e incubou-se as membranas por 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sob agitação vigorosa. Posteriormente, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem PBS 1X com Tween por três vezes e com PBS 1X sem Tween por uma vez, cada lavagem com duração de 15 minutos. Logo após, as membranas foram incubadas com tampão de fosfatase alcalina por 15 minutos, sob agitação suave. A reação foi revelada pela adição dos substratos: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e Azul de nitrotetrazolium (BCIP/NBT) (Sigma Aldrich).

## RESULTADOS

Os resultados dos estudos prévios realizados por Fonseca et al. (15), demonstraram que a GAPDH é uma proteína

potencialmente antigênica. Para se avaliar a possível reatividade da proteína recombinante purificada (37), foram realizados ensaios para determinação da reatividade dessa proteína com soros de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico de PCM e com soros de pacientes controle. Após eletroforese em gel de poliacrilamida (gradiente de 15% - 5%), 0,5 µg de rPbGAPDH foram transferidos para membranas de nitrocelulose, as quais foram submetidas a reação com soros de pacientes com PCM e pacientes controle.

Dentre os soros de pacientes com PCM analisados, 60 reagiram com a proteína rPbGAPDH, o que equivale a 100% de reatividade (Figura 2A). Os soros de pacientes controles não apresentaram reação significativa com a proteína rPbGAPDH (Figura 2B).



**Figura 2:** Análise da reatividade imunológica da proteína rPbGAPDH através de *immunoblotting*. A proteína purificada (0,5 µg) foi fracionada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida e transferida para membrana de nitrocelulose. **A** - A proteína recombinante rPbGAPDH foi submetida a reação com soros de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico de PCM (diluição 1:500). **B** - A proteína recombinante rPbGAPDH foi submetida a reação com soros de indivíduos não portadores de PCM (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.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Experimentos realizados em laboratório por Fonseca et al. (15), evidenciaram o potencial antigênico da molécula GAPDH. Os experimentos iniciaram-se com a análise do proteoma de *P. brasiliensis*, através de eletroforese bidimensional. Após ensaios de imunoblotting, verificou-se que uma proteína de 36 KDa, pI's 6,8 e 7,0 era fortemente reconhecida por uma combinação de soros de indivíduos portadores de PCM. Devido ao interesse do grupo em isolar e caracterizar antígenos do fungo *P. brasiliensis*, essa proteína foi excisada de gel e parcialmente sequenciada, após digestão com endoproteínase Lys-C.

Foram obtidas sequências da extremidade amino-terminal e de dois peptídeos internos. Essas sequências de aminoácidos foram comparadas com outras disponíveis em bancos de dados. As análises comparativas de homologia, da região amino terminal, mostrou identidade completa com a GAPDH de vários fungos (41). Verificou-se também alta homologia da sequência de aminoácidos dos dois peptídeos internos da proteína com gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de vários organismos (41). Dessa maneira, a proteína de 36 kDa passou a ser designada PbGAPDH.

Por meio do rastreamento de biblioteca de cDNA da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*, Barbosa et al. (17), obtiveram o cDNA completo e uma seqüência genômica codificante para GAPDH de *P. brasiliensis*, que foram posteriormente clonados e caracterizados. O cDNA apresenta 1.717 pares de bases e a seqüência genômica é constituída por cinco éxons, intercalados por quatro íntrons. A seqüência deduzida da proteína é constituída por 338 aminoácidos que apresentaram identidade de 88% com a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Histoplasma capsulatum*. Estudos posteriores mostraram que tanto a proteína quanto seu transcrito é expresso de forma ligada ao desenvolvimento do fungo, com expressão preferencial na fase leveduriforme (17). Esses resultados, associados à reatividade da proteína com soros de pacientes com PCM, reforça o potencial papel da GAPDH na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro.

Após obtenção do cDNA codificante para GAPDH (número de acesso AY 061958), o mesmo foi clonado no vetor de expressão

TOPO pET100 (Invitrogen TM, Life Technologies), resultando no plasmídeo TOPO-pET100-GAPDH. Após a transformação da *Escherichia coli* XL1 Blue, a expressão da proteína fusionada foi induzida pela adição de isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade seguindo as condições descritas pelo fabricante (GE Healthcare®). A proteína recombinante foi utilizada na produção de anticorpos policlonais em modelo animal (coelho) (37).

Adesão de micro-organismos patogênicos aos tecidos do hospedeiro é considerada indispensável para a colonização inicial e possível disseminação (38). Barbosa et al. (37), após realizarem experimentos de citolocalização (imunomicroscopia), verificaram que a GAPDH de *P. brasiliensis* além de estar presente no citoplasma, onde desempenha funções relacionadas as reações metabólicas da via glicolítica, também está localizada na parede celular, onde provavelmente é receptora comum de proteínas da matriz extracelular, desempenhando papel crucial para a aderência de *P. brasiliensis* aos tecidos do hospedeiro. Foi demonstrado também que a presença da proteína recombinante, bem como do anticorpo policlonal anti-GAPDH, promove a inibição da adesão e invasão de *P. brasiliensis* em culturas de células *in vitro*. Esses dados sugerem que a GAPDH provavelmente desempenha um papel no início do processo de colonização e disseminação do fungo nos tecidos do hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento da doença (37).

Após Barbosa et al. (37), terem induzido e purificado a proteína recombinante GAPDH de *P. brasiliensis*, iniciou-se os estudos sobre o papel da proteína na resposta imunológica da PCM. No presente trabalho, a proteína recombinante foi reconhecida, em ensaios de Western blotting, por 100% das amostras de soros de indivíduos com PCM e não apresentou reação com indivíduos não portadores da doença. Esses resultados reforçam o potencial papel da GAPDH como molécula antigênica na PCM.

Testes sorológicos são muito úteis no diagnóstico e acompanhamento dos estudos de pacientes com paracoccidioidomicose e antígenos altamente reativos são necessários. Proteínas recombinantes representam uma fonte de especificidade altamente

reproduzível, o que não é facilmente observado quando se trabalha com antígenos convencionais, obtidos a partir de filtrados de cultura celular. Alguns fatores críticos assim como o meio de cultura, o fungo, e o tempo de crescimento podem influenciar na produção de antígenos reativos de *P. brasiliensis*. Além disso, as proteínas recombinantes têm a vantagem adicional de uma produção imediata (48 horas versus 15 a 20 dias dos antígenos convencionais) (24).

Grupos de pesquisa da América Latina encontram-se engajados no isolamento e caracterização de proteínas antigênicas de *P. brasiliensis*. A produção de moléculas recombinantes poderá ser útil na obtenção de preparações contendo vários antígenos, o que possibilitará uma maior sensibilidade no diagnóstico de PCM. A expressão heteróloga de outras proteínas imunoreativas do fungo, já

foi descrita na literatura científica. Para exemplificar, a formamidase foi fortemente reconhecida por soros de pacientes portadores de PCM através da técnica de imunoblotting (20). Outra proteína antigênica caracterizada foi a HSP60 que após ensaios sorológicos demonstrou 90% de especificidade, 92% de sensibilidade, sendo considerado também um marcador em testes de sorodiagnóstico (13). Já a triose fosfato isomerase assim como a GAPDH foi reconhecida por soros de pacientes portadores de PCM, e não foi reconhecida por soros de pacientes não portadores de PCM (19). Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam o potencial papel da GAPDH como molécula antigênica na PCM. Assim rPbGAPDH poderá ser utilizada juntamente com outras proteínas imunoreativas do fungo *P. brasiliensis* em futuros imunodiagnósticos da PCM.

Rodrigo da Silva Santos, Nathalie Martelli de Paula, Mônica Santiago Barbosa, Célia Maria de Almeida Soares

*Endereço para correspondência* : Rodrigo da Silva Santos  
Universidade de São Paulo (USP)  
Av. Bandeirantes, 3.900  
Ribeirão Preto – SP  
CEP 14049-900  
E-mail: rdssantos@gmail.com

Recebido em 25/06/2011

Revisado em 15/09/2011

Aceito em 06/12/2011

## REFERÊNCIAS

- (1) RESTREPO, A.; TOBÓN, A. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DOLLIN, R. (Eds.), **Principles and Practice of Infectious Diseases**, Philad., pp. 3062–3068. 2005.
- (2) COUTINHO, Z.F.; SILVA, P.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno de Saúde Pública**. v. 18, p.1441-1454, 2002.
- (3) PANIAGO, A.M; AGUIAR, DA CUNHA, R.V.; PEREIRA, G.R.; LONDERO, A.T.; WANKE, B. Paracoccidioidomycose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p.455-459, 2003.
- (4) LUTZ, A. Uma micose pseudo-coccídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hiphoblastomicoses americanas. **Bras. Med.**, v. 22, p.121-124, 1908.
- (5) SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40, p.225-242, 2002.
- (6) MATUTE D.R; MCEWEN J.G.; PUCCIA R.; MONTES B.A.; SAN-BLAS G.; BAGAGLI E.; RAUSCHER J.T.; RESTREPO A.; MORAIS F.; NINO-VEGA G.; TAYLOR J.W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 65-73, 2006.
- (7) RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: DISMUKES W.E.; PAPPAS, P.G.; SOBEL, J. (Eds.), **Clinical Mycology**. Oxford University Press, New York, pp. 328–345. 2003.
- (8) CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; J.H.; CASTANO, J.H.; ZULUAGA, J.S.; HENAO, B.; ARANGO, M.; TABARES, A.M.; MATUTE, D. R.; MCEWEN, J.G.; RESTREPO, A. The naked-tailed armadillo *Cabassou centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Medical Mycology**, v. 43, p. 275-280, 2005.
- (9) RESTREPO, A., MCEWEN, J.G., CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v. 39, p.233-241, 2001.
- (10) RESTREPO A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabour**, v. 23, n. 5, p.323-34, 1985.
- (11) FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 5-18, 1987.
- (12) IZACC, S.M.S.; GOMÉZ, F.J.; JESUINO, R.S.A.; FONSECA, C.A.; FELIPE, M.S.S.; DEEPE JR, G.S.; SOARES, C.M.A. Molecular



cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, **Medical Mycology**, v. 39, p. 445-455, 2001

(13) CUNHA D.A, ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; FELIPE, M.S.S.; SALEM-IZACC, S.M.; DEEPE JR, G.S.; SOARES, C.M.A. Heterologous expression, purification and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*, **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 374-377, 2002.

(14) COSTA, A.A.; GÓMEZ, F.J.. PEREIRA, M.; FELIPE, M.S.S.; JESUÍNO, R.S.A.; DEEPE JR, G.S.; SOARES, C.M.A. Characterization of a gene which encodes a mannosyltransferase homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*, **Microbiology and Infection**, v. 4, p. 1027-1034, 2002.

(15) FONSECA, C.A.; JESUINO, R.S.A.; FELIPE, M.S.S.; CUNHA, D.A.; BRITO, W.A.; SOARES, C.M.A. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology and Infection**, v. 3, p.535-541, 2001.

(16) MOREIRA. S.F.I.; BAILÃO, A.M.; BARBOSA, M.S.; JESUÍNO, R.S.; FELIPE, M.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis **Yeast**, v. 21, p.173-82, 2004.

(17) BARBOSA, M.S., CUNHA-PASSOS, D.A.; FELIPE, M.S.S.; JESUÍNO, R.S.A.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A. The Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: Molecular and phylogenetic analysis, **Fungal Genetic and Biology**, v. 41, p. 667-675, 2004.

(18) CARNEIRO, L.C.; FARIA, F.P; FELIPE, M.S.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A. *Paracoccidioides brasiliensis* presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-biphosphate aldolase: protein isolation, cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic and expression analysis. **Fungal Genetic and Biology**, v. 42, p.51-60, 2005.

(19) PEREIRA, L.A.; PEREIRA, M.; FELIPE, M.S.S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; SOARES, C.M.A. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*, **Microbiology and Infection**, v. 6, p. 892-900, 2004.

(20) BORGES, C.L. ; SOARES, C.M.A. ; et al. The antigenic and catalytically active formamidase of *Paracoccidioides brasiliensis*: protein characterization, cDNA and gene cloning, heterologous expression and functional analysis of the recombinant protein. **Microbiology and Infection**, v. 7, n. 1, p.66-77, 2004.

(21) PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A.J. & TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, p. 199-206, 1996.

(22) CAMARGO, Z.P.; FRANCO, M.F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.17, p. 41- 48, 2000.

(23) 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, p. 1610-1615, 1991.

(24) ORTIZ, B.L.; GARCIA, A.M.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Immunological Characterization of a Recombinant 27-Kilodalton Antigenic Protein from *Paracoccidioides brasiliensis*, **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, p. 239–241, 1996.

(25) DIÉZ, S.; GÓMEZ, B.L.; RESTREPO, A.; *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodaltons antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification and detection via immunohistochemistry, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 359-365, 2002.

(26) DIÉZ, S.; GÓMEZ, B.L.; MCEWEN, J.G.; RESTREPO, A.; HAY, R.J.; HAMILTON, A. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked

immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1536-1542, 2003.

(27) CHESTER E.R.; FUKUTO J.M.; TAGUCHI K.; FROINES J.; CHO A.K. The interactions of 9,10-phenanthrenequinone with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a potential site for toxic actions. **Chemico Biological Interactions**, v. 97, p.110, 2005.

(28) PANCHOLI, V.; FISCHETTI, V.A. Regulation of the phosphorylation of human pharyngeal cell proteins by group A streptococcal surface dehydrogenase: signal transduction between streptococci and pharyngeal cell. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, p.1633-1643, 1997.

(29) GOZALBO, D., GIL-NAVARRO, I.; AZORÍN, I.; RENAUI-PIQUERAS, J.; MARTINEZ, J.P.; GIL, M.L. The cell wall associated glyceraldehyde-3-phosphate of dehydrogenase *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 2052-2059, 1998.

(30) CROWE, J.D.; SIEVWRIGHT, I.K.; AULD, G.C.; MOORE, N.R.; GOW, N.A.R.; BOOTH, N.A. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen binding proteins, **Molecular Microbiology**, v. 47, p.1637-1651, 2003.

(31) MAEDA, K.; NAGATA, H.; KUBONIWA, M.; KATAOBA, K.; NISHIDA, N.; TANAKA, M.; SHIZUKUISHI, S. Characterization of binding of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase to *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. **Infection and Immunity**, v. 72, p.5475-5477, 2004.

(32) HAKIMUDDIN, T.S.; GENCO, R.J. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase of epithelial cells as a second molecule that binds to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. **Immunity and Medical Microbiology**, p. 25-30, 2005.

(33) GOUDOT-CROZEL V.; CAILLOL D.; DJABALI M.; DESSEIM A. J. The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis a 37 kDa glyceraldehyde-3-P-deshydrogenase. **The Journal of Experimental Medicine**, p. 2065-74, 1989.

(34) TALLIMA, H.; MONTASH, M.; VEPREK, P.; VELEK, J.; JEZEK, J.; RIDI, R. Differences in immunogenicity and vaccine potential of peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Vac.**, v. 21, p. 3290-3300, 2003.

(35) GRACIA M.S.R.; MYIOSHI A.; AZEVEDO V.; SPLITTER G.A.; OLIVEIRA, S.C. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. **The Journal of Medical Microbiology**. v. 51, p. 661-671, 2002.

(36) LIU Y.; OSHIMA S.; KUROHARA K.; OHNISHI K.; KAWAI K. Vaccine efficacy of recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* against Edwardsiellosis. **Microbiology Immunology**, v. 49, n.7, p. 605-612, 2005.

(37) BARBOSA, M.S.; BÁO, S.N.; ANDREOTTI, P.F.; FARIA, F.P.; FELIPE, M. S.S.; FEITOSA, L.S.; MENDES-GIANNINI, M. J.S.; SOARES, C.M.A. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein, related to the fungus adhesion to extracellular matrix proteins and to the interaction with pneumocytes cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 382-389, 2006.

(38) GONZÁLEZ, A., GÓMEZ, B.L.; DIEZ, S.; HERNÁNDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A.J.; CANO, L.E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix protein. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 2486-2495, 2005.

(39) FAVA-NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arquivos de Cirurgia Clínica e Experimental**, v. 18, p.197-254, 1955.

(40) LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

(41) SINGH, R.; GREEN, M.R. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, **Science**, v. 259, p. 365-368, 1993.