

Análise de soros de pacientes com paracoccidioidomicose por Western Blotting

Análise de soros de pacientes com paracoccidioidomicose por Western Blotting

Luciene Airy Nagashima¹, Thiago Yuiti Castilho Massuda¹, Leonardo Oba¹,
Mari Sumigawa Kaminami², Eiko Nakagawa Itano³

Resumo

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). Uma variedade de testes sorológicos vem sendo explorada para possíveis fins de diagnóstico e acompanhamento de tratamento. No presente trabalho buscou-se o reconhecimento de frações de exoantígeno (exoAg) do fungo pelas amostras de soros de pacientes com PCM através do método de Western blotting. Foram analisadas 57 amostras, sendo 42 de pacientes com PCM e 15 de controles saudáveis. Os resultados obtidos demonstraram 90,5% reconhecimento de glicoproteína de ~43kDa (gp43), 28,6% de glicoproteína de ~27kDa (gp27), 23,8% de glicoproteína de ~70kDa (gp70) e 21,4% reconheceram a glicoproteína de ~150kDa (gp150). Pôde-se concluir que o método de Western blotting permite o reconhecimento de pelo menos 4 frações antigênicas do exoantígeno de Pb, sendo a gp43 a mais importante destas.

Palavras-chave: exoantígeno, *Paracoccidioides brasiliensis*, diagnóstico, Western blotting

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis and the causal agent is the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). A variety of

¹ Bolsista IC, PROPPG/UUEL

² Mestrado em Patologia Experimental

³ Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina.

serological tests has been explored for diagnosis and monitoring of treatment. In the present study, the fungal exoantigen (exoAg) fractions recognized by PCM patients' serum was investigated by Western blotting. Total of 57 samples of serum, 42 from patients with paracoccidioidomycosis (PCM) and 15 from healthy control were analyzed. The results demonstrated 90.5% recognition of ~43kDa glycoprotein (gp43), 28.6% recognition of glycoprotein ~27kDa (gp27), 23,8% glycoprotein ~70kDa (gp70) and 21.4% glycoprotein ~150kDa (gp150). In conclusion, at least four antigenic fractions in Pb exoAg can be recognized by Western blotting and the gp43 the most important of these.

Key words: exoantigen, *Paracoccidioides brasiliensis*, diagnosis, Western blotting

INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa crônica e sistêmica, tendo sido inicialmente descrita por Adolfo Lutz em 1908. Seu agente etiológico, o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), é termicamente dimórfico, sendo encontrado sob a forma miceliana ou filamentosa na natureza, a 23°C, e à forma de levedura quando submetida à temperatura corporal (37°C).

Estudos indicam que a prevalência da infecção é maior entre 30 e 50 anos, sendo semelhante entre homens e mulheres. Porém, a doença é manifesta principalmente em homens, fato este possivelmente explicado pela presença de receptores para estradiol na parede do fungo, o qual serviria para impedir a passagem da forma miceliana para a forma leveduriforme ⁽¹⁾.

A provável via de infecção primária da doença é a respiratória, através da inalação de propágulos miceliais e conversão intra-corpórea para a forma patogênica leveduriforme. Uma vez infectado, o indivíduo pode ou não desenvolver a doença ⁽²⁾. A doença se dá quando há presença

de sintomas, podendo ser aguda ou crônica ⁽³⁾. O fungo pode disseminar-se pelas vias linfática e hematológica e o quadro clínico é bastante variável, podendo haver sintomas gerais (queda do estado geral, emagrecimento, anorexia, cefaléia e febre, entre outros) e específicos, dependendo dos locais acometidos (possivelmente pulmões, linfonodos, mucosas e vias aéreas superiores, pele, glândulas adrenais, trato gastrointestinal, ossos e articulações, SNC, olhos, trato urogenital, tireóide e outros).

A presença do Pb no organismo gera respostas imunológicas humoral e celular ^(4, 5). Na resposta humoral estão envolvidas as imunoglobulinas IgG, IgM, IgE e IgA, com predomínio de IgG, que se encontra aumentada quando do diagnóstico e início do tratamento, decrescendo no decorrer da melhora clínica.

Devido à grande variedade de manifestações clínicas, os métodos investigativos não-clínicos vêm a ser importantes para o diagnóstico e acompanhamento da evolução da doença. A PCM é usualmente diagnosticada por exames clínicos e radiográficos para a detecção de lesões pulmonares, análise de materiais biológicos como escarro, pus e raspado de células, exames anatomopatológicos ou cultura do fungo. No entanto, nem sempre é possível a identificação direta do agente, sendo necessária a utilização de outros métodos. Vários testes sorológicos vêm sendo descritos para fins diagnósticos e de acompanhamento, sabidamente Imunodifusão Radial Dupla, Fixação do Complemento, testes de aglutinação, Imunofluorescência, métodos imunoenzimáticos e “Western blot” ^(6, 7, 8; 9; 10).

Com a finalidade de melhorar a especificidade dos métodos sorológicos tem-se buscado um antígeno específico para o *P. brasiliensis*. O Pb em cultura libera várias glicoproteínas, e uma delas, a gp43 (glicoproteína de peso

molecular 43kDa) produzida pela cepa B-339, é considerada um padrão para a produção de antígenos, sendo utilizada pelos principais laboratórios da América Latina. A gp43 encontra-se em maior concentração nos sobrenadantes de cultura (exoantígeno) de meio TOM e também após cultivo em meios sólidos de Sabouraud ⁽⁷⁾. Esta glicoproteína é liberada pelo Pb em sua forma leveduriforme por exocitose e é considerada um antígeno paracoccidioidomicose-específica ⁽¹¹⁾ constituindo, portanto, um importante marcador para a investigação sorológica. O objetivo do presente trabalho foi determinar as glicoproteínas presentes em preparado de exoantígenos que são reconhecidas pelas amostras de soros de pacientes com paracoccidioidomicose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de soros

Foram utilizadas alíquotas de soros de pacientes com PCM de forma crônica atendidos no Hospital Universitário (HU) e Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Londrina. Os controles foram coletados de indivíduos saudáveis (professores, alunos e funcionários da UEL). O sangue foi centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos, e o soro foi alíquotado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

Exoantígeno de P. brasiliensis (exoAg)

Foi utilizado o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* B-339, mantido em meio ágar Sabourand (Difco), à temperatura ambiente, na forma miceliana. Para conversão à fase leveduriforme, o fungo foi repicado para meio ágar Sabourand acrescido de 0,01% de solução de cloreto de tiamina (Merck) esterilizada por filtração e adicionada ao meio e 0,14% de

Bacto asparagina (Difco) e incubado a 35°C. As culturas foram então repicadas a cada 3 dias até a completa conversão para a fase leveduriforme, e mantidas nessa forma para o estudo. O meio de cultura usado para a obtenção do exoantígeno foi o meio TOM. Para o preparo do exoantígeno bruto, segundo CAMARGO et al., 1988 ⁽⁷⁾, o crescimento fúngico de tubos com culturas de 3 dias em ágar Sabourand foi transferido para um frasco com 50 mL de meio TOM. Este pré-inóculo foi transferido para frasco de 2000 mL contendo 500 mL de meio cultivado por 7 dias a 35°C, em plataforma de agitação horizontal circular. Após este período, o crescimento foi interrompido com a adição de mertiolate de sódio (0,2g/L) e as células foram separadas por filtração em papel de filtro. O filtrado obtido foi concentrado aproximadamente 20 vezes por evaporação a vácuo, e dialisado contra água destilada por 48 horas, com várias trocas. O material resultante da diálise foi filtrado e liofilizado seguindo-se a dosagem de proteínas segundo o método de Bradford ⁽¹²⁾.

WESTERN BLOTTING

Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com gel de empilhamento de 3% e pente com duas canaletas, sendo uma maior para a amostra e uma menor lateral para os padrões de pesos moleculares (180kDa, 116kDa, 84kDa, 58kDa, 48,5kDa, 36,5kDa e 26,2kDa). Amostra de 300µL de exoAg numa concentração de 100mg/mL, com 300µL de tampão de amostra, 2 vezes concentrado foram corridos em tampão Tris-glicina, pH 8,6, 0,1M a 100volts, até que o corante indicador chegasse ao final do gel. Montou-se então o sistema de transferência para a membrana de nitrocelulose em cuba de transferência e tampão de transferência, e a corrida foi realizada a 4°C, por uma noite a 20 volts. A membrana foi tratada com tampão de

bloqueio e, após lavagem, foi cortada em tiras para a realização dos testes com as amostras de soros (diluídos 1/40 em PBS-T-G), aplicando-se 1,2mL da diluição por tira, incubando-a por uma hora a 37°C. Após este período foram realizadas as lavagens com PBS-T (5 vezes), e aplicação do conjugado peroxidase anti-IgG humana (total) (1/1000, 1,2mL por tira) e incubada a 37°C por 1 hora. Seguiu-se então nova lavagem e aplicação do substrato (H₂O₂) e cromógeno DAB (diaminobenzidine) para a revelação. A interrupção da reação foi realizada por lavagem das tiras em água destilada. A parte lateral do gel com padrões de pesos moleculares foi corada pela prata. Para a coloração pela prata, o gel foi fixado por 30 minutos a temperatura ambiente, em solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. A seguir, foi lavado três vezes durante 10 minutos cada, com uma solução de etanol e ácido acético. Logo após, o gel foi colocado em solução oxidante de ácido nítrico e dicromato de potássio por cinco minutos cada. Em seguida, foi adicionada solução de nitrato de prata. Após 20 minutos, o gel foi lavado em água destilada durante 1 minuto e colocado em solução reveladora de carbonato de sódio e formaldeído. Após o aparecimento das bandas a revelação foi interrompida com ácido acético a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico definitivo da PCM é resultado de exame direto do material biológico do paciente, como escarro, pus, fragmento de biópsia e outros, com a demonstração da presença do *P. brasiliensis*. Porém, a obtenção destes materiais nem sempre pode ser efetivada com facilidade, o que abre uma possibilidade de instituir-se exames indiretos para o diagnóstico de pacientes com sinais e sintomas clínicos. Os testes

sorológicos permitem, além do diagnóstico, a possibilidade de acompanhamento do paciente sob tratamento e sua avaliação prognóstica.

Em dependência da metodologia empregada, a forma de obtenção e o tipo do antígeno podem influenciar no resultado. A utilização do meio TOM foi escolhida em decorrência da padronização prévia deste método no nosso laboratório, com excelentes resultados na obtenção de exoantígeno de Pb.

Através do método Western blotting foram reconhecidas 4 frações antigênicas: a glicoproteína de ~43kDa (gp43), glicoproteína de ~27kDa (gp27), glicoproteína de ~70kDa (gp70) e a glicoproteína de ~150kDa (gp150) de exoAg, sendo reconhecidos por 90,5%, 28,6%, 23,8% e 21,4%, respectivamente, de soros de pacientes com PCM (figura 1).

Blotta e Camargo ⁽¹³⁾ verificaram através de imunoblot que 100% dos soros de pacientes com paracoccidiodomicose reconheciam a gp43. Embora a nossa fonte de exoAg tenha sido a Pb 339, possivelmente a nossa menor sensibilidade a gp43 pode ser devido a menor concentração de gp43 presente no fungo, como consequência de repiques sucessivos no laboratório. Alteração na virulência tem sido observada com repiques de fungos, sendo necessário o seu re-isolamento por passagens em animais de laboratório ^(14, 15).

Embora o método de Western blotting apresente alto custo e complexidade de execução, permite reconhecimento de vários antígenos de *P. brasiliensis* em um único ensaio.

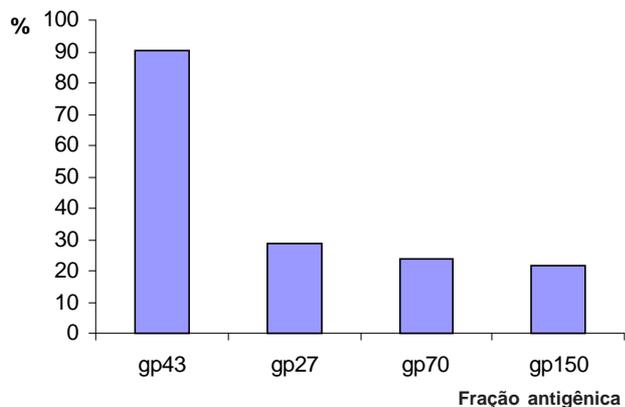


Figura 1. Frequência de reconhecimento de 4 frações antigênicas por soros de pacientes com paracoccidioidomicose (n=42) analisados pelo método de “Western blotting”.

CONCLUSÃO

O Western blotting demonstrou que a gp43 é o componente de exoAg reconhecido com maior frequência pelos soros de pacientes com PCM, além de permitir a detecção de outras frações antigênicas simultaneamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.6, p.89-117, 1993.
2. Franco MF, Montenegro MRG, Mendes RP et al. Paracoccidioidomycosis. A recently proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* v.20, p.129-132. 1987.
3. Franco MF, Montenegro MRG. Anatomia patológica. In: Del Negro G, Lacaz C da S. Paracoccidioidomicose: blastomicose sul-americana. São Paulo: Sarvier. p.97-117. 1982.

4. Mok PWYL, Greer DL. Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.*, v.28, p.89-98, 1977.
5. Arango M, Yarzabal L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v.79, p.115-124, 1982.
6. Cano LE, Restrepo A. Predictive values of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.20, p.276, 1987.
7. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigen for immunodiffusion tests. *Journal Clin. Microbiol.*, v.26, p.2147-2151, 1988.
8. Silva MIC, Chamma LG, Franco M. Reação de Imunodifusão em gel de ágar no diagnóstico sorológico da paracoccidioidomycose. *Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.31, n.40-43, p.40-43, 1989.
9. Bueno JP, Giannini MJSM, Del Negro GMB et al. IgG, IgM, and IgA antibodies response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. *Journal of Medical & Veterinary Mycology*, v.35, p.213-217, 1997.
10. Hamilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and peniciliosis marneffeii; current status and future trends. *Med. Mycol.*, v.36, p.351-364, 1998.
11. Straus AH, Freymüller E, Travassos LR. et al. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *Journal of Medical & Veterinary Mycology*, v.34, p.181-186, 1996.
12. Bradford EC. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v. 72, p. 248-254, 1976.
13. Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 31(3):671-6, 1993.

14. Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage. *Mycopathologia*;109(1):13-7, 1990.
15. Kashino SS, Singer-Vermes LM, Calich VL, Burger E. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its in vitro growth. *Mycopathologia*;111(3):173-80, 1990.