

Tratamento de Antígeno de Alta Massa Molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* com Papaína e Detecção de Subcomponentes Antigênicos

Treatment of High Molecular Mass Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with Papain and Detection of Antigenic Subcomponents

Mari Sumigawa Kaminami¹, Bianca Dorana de Oliveira Souza¹, Audrey de Souza Marquez¹, Adriane Lenhard-Vidal², Flávio Hiroshi Itano¹, Franciele Ayumi Semencio Chiyoda-Rodini¹, Igor Massahiro de Souza Sugiura¹, Mario Augusto Ono¹, Eiko Nakagawa Itano¹

¹Departamento de Imunologia, Parasitologia e Patologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil.

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, CPTL, Três Lagoas, MS, Brasil.

Endereço para correspondência:

Eiko Nakagawa Itano

Laboratório de Imunologia Aplicada - Depto. Imunologia, Parasitologia e Patologia Geral - Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina - Campus Universitário - 86051-970, Londrina, PR, Brasil. Fone: 55.43.33714469, FAX: 55.43.33714207

E-mail: itano@uel.br

Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica e crônica causada pelos fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides*, os quais produzem antígenos de alta massa molecular (hMM) que induzem resposta imune do tipo Th1 protetora. Os fragmentos menores, mas ainda antigênicos/imunogênicos, podem ser úteis para o desenvolvimento de vacinas bem como para o imunodiagnóstico. Este estudo teve como objetivo caracterizar parcialmente componentes da fração hMM por meio de tratamento enzimático com papaína. Inicialmente, a fração hMM foi obtida por cromatografia a partir de antígeno *cell-free* produzido por *P. brasiliensis* cepa 18 (Pb18). A fração foi então tratada com papaína a 37 °C por 4 horas e posteriormente fracionada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). As frações resultantes foram analisadas inicialmente por *dot blotting* e, em seguida, por *western blotting*, utilizando IgG de um pool de soros de pacientes com PCM. Os resultados revelaram a positividade de duas frações no *dot blotting*, enquanto o *western blotting* indicou a presença de uma banda de alta massa molecular e outra de aproximadamente 70 kDa. Concluímos com esses dados preliminares que o tratamento da fração hMM com a enzima papaína pode gerar um subcomponente de aproximadamente 70 kDa com atividade antigênica.

Palavras-chave: Fungo, Imunodiagnóstico, Paracoccidioidomicose, Vacina

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a chronic systemic granulomatous disease caused by the dimorphic fungi of *Paracoccidioides* genus, which produce high molecular weight (hMM) antigens that induce a protective Th1 immune response. The smaller but still antigenic/immunogenic fragments may be useful for vaccine purposes as well as for immunodiagnosis. This study aimed to partially characterize components of the hMM fraction by enzymatic treatment with papain. Initially, the hMM fraction was obtained by chromatography from cell-free antigen produced by *P. brasiliensis* strain 18 (Pb18). The fraction was then treated with papain at 37°C for 4 h and subsequently fractionated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The resulting fractions were analyzed initially by dot blotting and then by Western blotting, using IgG from a pool of sera of patients with PCM. The results revealed the positivity of two fractions in the dot blotting and the western blotting indicated the presence of a high molecular mass band and another of approximately 70kDa. We conclude from these preliminary data that the treatment of the hMM fraction with the enzyme papain can generate a subcomponent of approximately 70kDa with antigenic activity.

Keywords: Fungus, Immunodiagnosis, Paracoccidioidomycosis, Vaccine

INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa, sistêmica e de evolução crônica causada pelos fungos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. A PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz, e a nova espécie *P. lutzii*, foi formalmente proposta em 2014 com base em evidências moleculares, filogenéticas e fenotípicas que mostraram diferenças significativas em relação a *P. brasiliensis*. Isolados de *Paracoccidioides* denominados "Pb01-like" foram associados a casos de PCM diagnosticados principalmente na região Centro-Oeste do Brasil⁽¹⁻³⁾.

No *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis* realizado em fevereiro de 1986, em Medellín, Colômbia, foi definida uma classificação relacionada à história natural da doença PCM: a) infecção; b) doença de forma aguda, ou subaguda (juvenil), ou forma crônica (adulto), ou forma residual (sequelas). A forma aguda é mais severa e rara e, a forma crônica, pode se apresentar de forma benigna e localizada (unifocal) até casos mais severos e disseminados (multifocal), dependendo da eficiência da imunidade celular do indivíduo⁽⁴⁾.

Os indivíduos que apresentam PCM com forma crônica-unifocal geralmente apresentam a resposta imune celular associada a células T-helper 1 (Th1), enquanto os indivíduos que apresentam PCM aguda, crônica-disseminada (multifocal) apresentam resposta T-helper 2 (Th2), baseada na classe ou subclasse de imunoglobulinas G (IgG) e no padrão de citocinas produzidas^(5,6).

Marquez et al., (2005) observaram altos níveis de IgG e não de IgE a componentes de alta-MM (hMM) de aproximadamente 386 kDa de *P. brasiliensis* no soro de pacientes com PCM na forma crônica, mas não na forma aguda da doença, sugerindo a não indução da resposta Th2⁽⁷⁾. Considerando a possibilidade da resposta imune à fração hMM ser benéfica ao hospedeiro, Pavanelli et al., (2007) estudaram atividade protetora da fração de alta massa molecular de *P. brasiliensis* em camundongos Balb/c, evidenciando que

ocorre uma imunidade protetora parcial, com diminuição de crescimento de colônias (CFU) e diminuição de antígenos circulantes⁽⁸⁾.

Este estudo teve como objetivo caracterizar parcialmente o componente de hMM de *P. brasiliensis* e analisar a antigenicidade das suas sub-frações obtidas por digestão com a enzima papaína.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de Antígeno *cell free* (CFA Pb18)⁽⁹⁾

O antígeno *cell free* foi obtido de *P. brasiliensis* cepa 18 (Pb18), cultivado em Ágar Sabouraud por 5 dias a 35°C. Após cultivo de 5 dias, foi adicionada solução salina-fosfato tamponada (PBS 0,15M e pH 7,4), com inibidor de protease PMSF a 2,5 mM (Sigma) e solução timerosal a 0,02%, homogeneizada em vórtex durante 15 minutos e centrifugada a 13.600 g a 4°C. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Folin⁽¹⁰⁾.

Cromatografia em Coluna de Sephadex G-200

Amostra de 9 ml de CFA Pb18 (4 mg/ml) foi aplicada em Coluna de Sephadex G-200 seguida de eluição com PBS 0,15M pH 7,4. As frações obtidas pelo coletor automático de frações foram analisadas em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000UV) a 280 nm.

Digestão da fração de hMM com enzima Papaína

Amostra de 50 µL da fração de hMM (2 µg) foi incubada com 50 µL de papaína (10 mg) e 0,3M tampão iodoacetamida (Sigma) a 37°C durante 1 h, 2 h, 4 h e 8 h.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Amostra de 100 µL da fração F17 (Coluna Sephadex G-200), foi re-fracionada em coluna de HPLC (Varian Pro Star), em coluna semi-analítica C18. Foi utilizado tampão gradiente: 50% tampão acetato de amônio (Merck, Alemanha) 300 mM pH 7,0 e 50% de água bidestilada (Milli Q). A pressão empregada foi 1410 a 97 bars, 2 mL/min. As concentrações das proteínas de sub-frações foram dosadas pela técnica de Folin e armazenadas a -80°C.

Análise das frações obtidas por Coluna de HPLC por *dot blotting*

Amostras de 2 µL de frações e sub-frações de hMM foram pipetadas em membrana de nitrocelulose (Gibco Invitrogen Corporation, Long Island, New York, EUA). A membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado 5% com tween 20 em PBS 0,15M por 1 hora em temperatura ambiente. Após 4 lavagens (leite desnatado 0,5% com tween 20 em PBS 0,15M), a membrana foi incubada com “pool” de soros de pacientes PCM positivos diluído 1:40, por 2h a 37°C. Após novas lavagens a membrana foi incubada com conjugado anti-IgG humana-peroxidase (Sigma 8775) por 1:30 h a 37°C. A reação foi evidenciada com solução de diaminobenzidina (DAB - Sigma) e peróxido de hidrogênio em PBS 0,15M.

Western blotting

Amostras de CFA Pb18 (4 mg/ml), fração F17 e sub-fração de hMM-HPLC (preparadas previamente v/v em tampão de amostra 2 vezes concentrado, fervidas e centrifugadas) e padrão de proteína de MM de 10-200 kDa foram submetidas a eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida de 5-15%. Após a corrida, em tampão tris

glicina 1 M (Pharmacia Biotech – Sweden e Sigma Co., Germany), pH 8,2 a 100 V, as amostras foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Gibco Invitrogen Corporation, Long Island, New York, USA) em tampão tris-HCl-metanol a 23 V por 18 horas e 100 V por 1 h. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio por 1 h à temperatura ambiente, seguida de lavagem com tampão de lavagem. Foi adicionado solução de “pool” de amostras de soros de pacientes com PCM (Banco Biológico do Laboratório de Imunologia Aplicada, UEL, positivos por ELISA com exoantígeno, diluído 1:40 por 2h a 37°C, seguida de lavagens com tampão de lavagem e adição de conjugado anti-IgG humana-peroxidase diluído 1:3000 (Sigma A-8775, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), por 1:30 h a 37°C. A membrana foi novamente lavada e a revelação foi realizada com DAB (diaminobenzidina-Sigma Co., USA) em PBS 0,15M e peróxido de hidrogênio.

RESULTADOS

Cromatografia de CFA Pb18 em Coluna de Sephadex G-200

O perfil espectrofotométrico das frações de CFA Pb18 em Coluna de Sephadex G-200, a 280 nm é apresentado na figura 1. O primeiro pico (tubo 17) foi considerada a fração de hMM e denominada de F17 (~380 KDa), de acordo com Marquez et al., (2005)⁽⁷⁾.

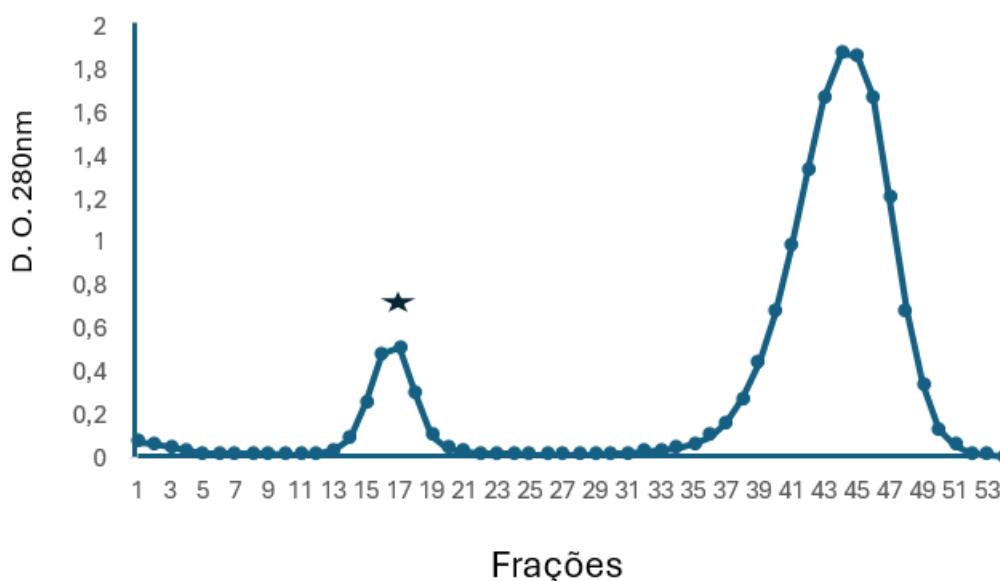


Figura 1. Perfil espectrofotométrico a 280 nm de CFA de Pb18 por cromatografia em coluna Sephadex G-200. (A estrela indica a fração 17) corresponde ao antígeno de hMM, denominada F17.

Cromatografia em coluna de HPLC do produto da digestão da Fração 17 com papaína

O perfil espectrofotométrico a 280 nm do produto de digestão da F17 com a enzima papaína em coluna de HPLC é apresentada na figura 2. As frações reativas com soros de pacientes com PCM por *dot blotting* foram denominadas de F17_I (tubos 2 a 11) e F17_{II} (tubos 23 a 25).

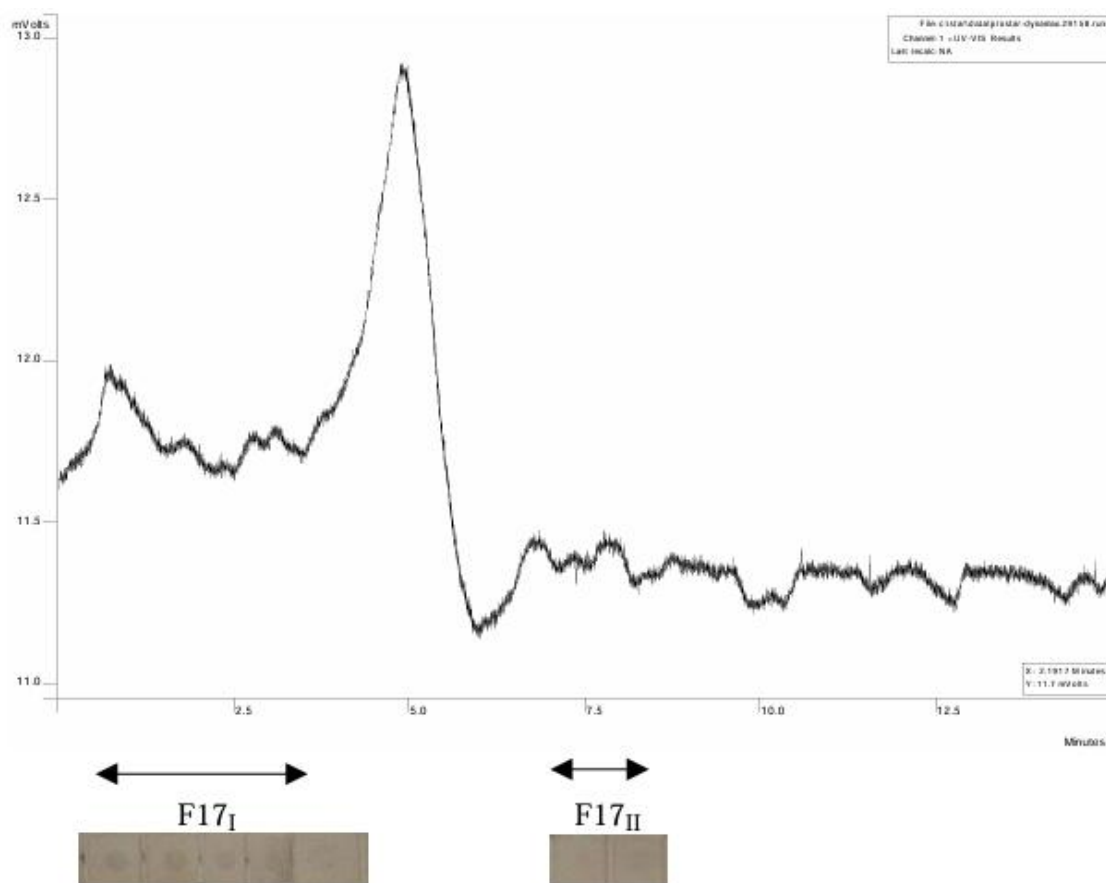


Figura 2. Perfil espectrofotométrico a 280 nm do produto de digestão da F17 com a enzima papaína (37°C durante 4h) por HPLC. Positividade em *dot blotting* com *pool* de soros de pacientes com PCM, foram denominadas F17_I e F17_{II}.

Western blotting

O resultado do *Western blotting* demonstrou a presença de várias bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos policlonais anti-*P. brasiliensis* no preparado CFA, uma banda difusa de ~380 kDa na fração F17 e bandas de ~380 kDa e ~70 kDa na F17 tratada com enzima papaína, a 37°C durante 4 horas (Figura 3). Em diferentes tempos de incubação (1h, 2h, 4h e 8h) com papaína, as mesmas bandas (~380 kDa e ~70 kDa) foram identificadas (Figura 4).

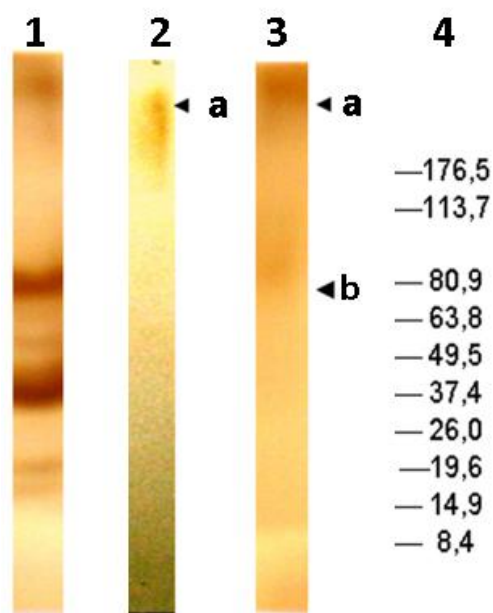


Figura 3. Resultado de *Western blotting*. 1) CFA de Pb18, 2) F17, 3) F17 tratada com enzima papaína F17 e 4) Padrão de MM. (a) banda de ~380 kDa e (b) banda de ~70 kDa.

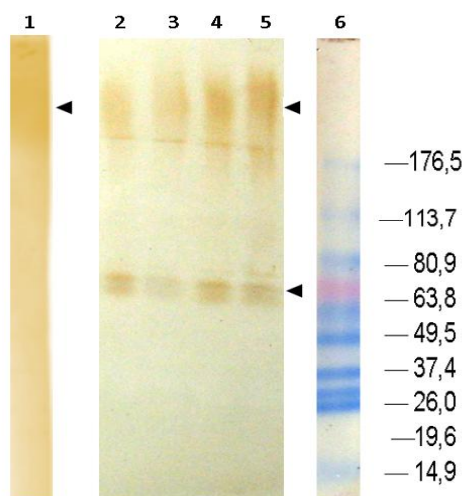


Figura 4. Análise da fração 17 (F17) sem tratamento (1), fração F17 tratada com enzima Papaína a 37°C nos tempos de 1h (2), 2h (3), 4h (4), 8h (5) e padrão de MM (6), por *Western blotting*, (seta superior) ~380 kDa e (seta inferior) ~70 kDa.

DISCUSSÃO

A papaína é uma cisteína endopeptidase que apresenta elevada atividade proteolítica sobre uma ampla gama de substratos, com a vantagem de atuar em diferentes condições de pH e temperatura⁽¹¹⁾. A fragmentação enzimática de antígenos por papaína constitui uma abordagem eficaz para a caracterização de componentes imunorreativos de alta massa molecular.

Neste estudo, demonstramos pela primeira vez que o componente antigênico de alta massa molecular (~380 kDa), obtido de *P. brasiliensis*, gera um fragmento de aproximadamente 70 kDa após o tratamento com papaína. Esse fragmento foi reconhecido por IgG de pacientes com PCM em ensaios de *western blotting*, sugerindo atividade antigênica preservada. De maneira complementar, a separação das sub-frações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também revelou duas frações reativas por *Dot blotting* e *Western blotting*, evidenciando a presença de uma banda de ~70 kDa e outra de alta MM. A persistência da banda de alta MM pode indicar resistência parcial à clivagem, possivelmente atribuída à presença de carboidratos que dificultam o acesso enzimático⁽¹²⁾. A coloração positiva com PAS (ácido periódico de Schiff), conforme descrito por Lenhard-Vidal et al. (2018)⁽¹³⁾, corrobora a presença de carboidratos nesta fração. Essa heterogeneidade de glicosilação pode explicar o comportamento eletroforético variável observado para o componente hMM.

Quanto à banda de ~70 kDa obtida, esta pode representar uma nova molécula derivada do hMM ou corresponder a proteínas anteriormente descritas em *Paracoccidioides* spp. Diversas proteínas com massa molecular nessa faixa já foram identificadas, com funções associadas à virulência e imunogenicidade. Entre elas, destaca-se a gp70, reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM⁽¹⁴⁾. Essa glicoproteína não só se mostra útil como marcador sorológico, mas também atua como agente imunomodulador *in vitro*, sendo capaz de inibir a fagocitose e a produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos⁽¹⁵⁾. Adicionalmente, anticorpos monoclonais dirigidos contra gp70 conferiram proteção em modelos murinos de PCM quando administrados no início ou durante a infecção. Outra proteína relevante é a HSP70 (Heat Shock Protein 70), que também possui massa molecular de ~70 kDa, é expressa constitutivamente e sob estresse térmico, e pode ser reconhecida por soros de pacientes com PCM^(16,17).

A obtenção de fragmentos menores, como o de 70 kDa, a partir do hMM é particularmente relevante por dois motivos principais. Primeiro, a fração hMM de *P. brasiliensis* já demonstrou capacidade de induzir resposta Th1 protetora em modelos experimentais murinos de PCM⁽⁸⁾. A identificação de subcomponentes que conservem essa atividade imunológica pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas mais específicas e seguras. No entanto, neste estudo preliminar, ainda não foi avaliado se o fragmento de 70 kDa mantém a capacidade de induzir resposta Th1.

O uso de subcomponentes menores pode beneficiar o diagnóstico sorológico da PCM. É bem estabelecido que *P. lutzii* não expressa gp43, ou a produz em concentrações muito baixas, o que compromete a sensibilidade de testes baseados exclusivamente nesse antígeno⁽¹³⁾. Fredrich et al. (2010) detectaram a presença de uma fração hMM em 19 isolados clínicos de *P. brasiliensis* e em um isolado de *P. lutzii* (LDR2), bem como na cepa de referência Pb18, sugerindo que esse componente é amplamente conservado⁽¹⁸⁾. Por apresentar alta massa molecular e ser rica em carboidratos, essa fração pode gerar reações cruzadas. No entanto, fragmentos menores derivados dessa fração, desde que mantenham antigenicidade, podem apresentar maior especificidade e reprodutibilidade, tornando-se candidatos promissores para o desenvolvimento de novos reagentes diagnósticos, o que requer estudos adicionais.

Em conclusão, os dados aqui apresentados demonstram que o tratamento do componente hMM de *P. brasiliensis* com a enzima papaína gera um fragmento de aproximadamente 70 kDa com atividade antigênica, representando uma abordagem inicial na caracterização de subcomponentes imunorreativos deste fungo.

AGRADECIMENTOS

Fundação Araucária/PR, PROPPG/PROEX, UEL e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 65–73, 2006.
2. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides brasiliensis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52: 273–283, 2009.
3. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. *Paracoccidioides lutzii*: biological and clinical implications. *Medical Mycology*, 52: 19–28, 2014.
4. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 25: 5–18, 1987.
5. Singer-Vermes LM, Calich VLG, Burger E, Kashino SS, Nishioka K. Serum levels of cytokines in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 67: 122–128, 1993.
6. Baida H, Biselli PJ, Juvenale M, Del Negro G, Mendes-Giannini MJS, Benard G, et al. IgG subclasses against *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins in patients with paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, 37: 183–189, 1999.
7. Marquez AS, Vicentini AP, Ono MA, Watanabe MA, de Camargo ZP, Itano EN. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic paracoccidioidomycosis to a high molecular mass antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 19: 199–204, 2005.
8. Pavanelli WR, Kaminami MS, Geres JR, Sano A, Ono MA, Camargo ICC, Itano EN. Protection induced in BALB/c mice by the high-molecular-mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, 163: 117–128, 2007.
9. Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 29: 31–38, 1991.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265–275, 1951.
11. Fernández-Lucas J, Acebal C, García B, Sánchez-Moreno I, Arroyo M. Papain-catalyzed reactions: a review. *Catalysts*, 7: 318, 2017.

12. Raju TS. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Current Opinion in Immunology*, 20: 471–478, 2008.
13. Lenhard-Vidal A, Assolini JP, Chiyoda FAS, Ono MA, Sano A, Itano EN. Polyclonal antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* are able to recognise antigens from different strains from *Paracoccidioides* species complex, including *Paracoccidioides lutzii* LDR2. *Mycoses*, 61: 826–832, 2018.
14. Blotta MHSL, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PM, Mendes-Giannini MJS. Purification of a specific antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* and its use in immunodiffusion tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2402–2407, 1993.
15. de Mattos Grosso D, de Almeida SR, Mariano M, Lopes JD. gp70 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage function. *Microbes and Infection*, 5: 111–118, 2003.
16. da Silva SH, Thomaz L, Marques AF, Ferri L, Travassos LR. Molecular cloning and characterization of the *Paracoccidioides brasiliensis* heat shock protein 70 gene and analysis of HSP70 expression. *Infection and Immunity*, 67: 5686–5693, 1999.
17. Bisiô C, Dos Santos M, da Silva SH, Marques AF, Cisalpino PS, de Almeida Soares CM. Identification and characterization of an HSP70 homolog in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology*, 43: 493–500, 2005.
18. Fredrich AL, Nagashima LA, Pavanelli WR, Marquez AS, Kaminami MS, Carlos NJ, et al. High molecular mass fraction in clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43: 526–530, 2010.