

PRODUÇÃO DE EXOANTÍGENO DE *Sporothrix spp.* EM FASE MICELIAL

DÉBORA MATILDE DE ALMEIDA¹; TATIÉLEN HERNANDEZ SEVERO²; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA³; RENATA OSÓRIO DE FARIA⁴; MÁRCIA DE OLIVEIRA NOBRE⁵; SÉRGIO JORGE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – deby.almeida@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – tatihsevero@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – renata.osorio@ufpel.edu.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – marciaonobre@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – sergiojorgevet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de implantação causada pelo complexo *Sporothrix spp.*, afetando a pele e o tecido subcutâneo (GREMIÃO et al., 2020). A doença é transmitida pela inoculação traumática do agente pelo contato com solo e atividades de jardinagem ou por mordidas e arranhaduras de gatos infectados (RAMÍREZ-SOTO et al., 2018). A esporotricose já foi descrita em diversas espécies, como canídeos, murinos, equídeos, ruminantes; no entanto, o gato é o mais acometido por essa doença (CROTHERS et al., 2009; DALIS et al., 2014). Nestes animais, a micose pode se manifestar de forma cutânea, linfática ou disseminada, cujo última pode ser fatal. As lesões são geralmente encontradas na região cefálica, em plano nasal e orelhas, e na região de membros e posterior (GREMIÃO et al., 2020).

Como diagnóstico definitivo, o isolamento do *Sporothrix spp.* em cultura micológica, seguido da identificação por caracterização morfológica e conversão para a fase leveduriforme é o padrão-ouro (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Todavia, outros métodos tem sido desenvolvidos, principalmente a partir da detecção de anticorpos de pacientes, como no Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) por exemplo, método sorológico alternativo e mais rápido em comparação a cultura micológica (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2005).

Para tanto, várias preparações antigênicas tem sido utilizadas em busca de ELISA com alta sensibilidade e especificidade, seja por meio de proteínas recombinantes, proteínas purificadas ou exoantígenos, na forma leveduriforme ou micelial (FERNANDES et al., 2011; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2019). Especialmente na forma micelial, a expressão de antígenos de interesse ocorre em sua maioria na fase estacionária em cultura em caldo Sabourand, resultando em bandas abrangendo 50 a 90 kDa (MENDONZA et al., 2002). Quando utilizada como antígeno no ELISA para diagnóstico de pacientes humanos acometidos por esporotricose, sensibilidade de 100% e especificidade de 98% foram relatadas (ALVARADO et al., 2015). Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um exoantígeno proveniente da fase micelial de isolados de *Sporothrix spp.*, para futura aplicação em um ELISA para diagnóstico de esporotricose felina.

2. METODOLOGIA

Isolado e cultivo

Foi utilizado o isolado 59 de *Sporothrix spp.* cedido gentilmente pelo centro de diagnóstico e pesquisa em micologia veterinária da Universidade Federal de Pelotas

(MICVet – UFPel). Utilizando a metodologia de Mendonza et al. (2002) modificada, o isolado foi repicado em meio ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cultivado por sete dias a 25 °C. Por meio de uma alça microbiológica, uma região do cultivo foi utilizada para inocular dois frascos Erlenmeyer contendo 250 ml de caldo Sabouraud. Os frascos foram mantidos em agitação constante de 100 rpm e 25 °C por 14 dias.

Filtrado do cultivo

Após o período relatado acima, uma amostra de cada frasco foi coletada e submetida a coloração de Gram para avaliar a possibilidade de contaminação por bactérias e também as formações miceliais características do fungo. Eliminada a possibilidade de contaminantes, o sobrenadante de cada cultivo foi filtrado por meio de uma membrana Millipore 0,45 de modo lento. O filtrado foi dialisado (Thermoscientific Snake Skin 10000 MWCO) em água destilada a 4 °C com trocas diárias por três dias seguidos e o conteúdo final foi concentrado por evaporação em estufa até redução de 50% do volume inicial. O antígeno foi armazenado congelado até o uso.

SDS-PAGE e Western blot

O concentrado foi quantificado a partir do kit de albumina sérica bovina como proteína padrão e sua expressão foi confirmada por meio de eletroforese em gel unidimensional de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). O potencial antigênico foi avaliado pela técnica de *Western Blot*. Conforme descrito por Laemmili (1970), com o término da eletroforese, o gel foi reservado em recipiente com água destilada até a montagem do aparato na cuba de transferência (Biorad Transblot SD Semi-dry Transfer Cell, Hercules, CA, USA). Foram dispostas duas esponjas de 3 mm, seguido de uma membrana de nitrocelulose, o gel de poliácridamida e mais duas esponjas, sendo todo conjunto umedecido individualmente com tampão de transferência 1x (39 mM glicina/48 mM tris-base/ 0,037% SDS 20% metanol). O aparato foi preso com as travas acopladas na cuba e a corrente foi mantida a 15V, a 0,3A por 30 minutos. Ao fim da eletrotransferência, o gel foi descartado e a membrana de nitrocelulose foi mantida embebida com o tampão de bloqueio 5% (1,25 g de leite em pó desnatado; 25 ml de PBS-T) overnight e em câmara fria. Após o tempo proposto, a membrana foi lavada quatro vezes em intervalos de um minuto com PBS-T. A membrana foi embebida com um pool de soros de cinco animais diagnosticados com esporotricose, na diluição 1:500 e sob agitação leve por 1 h (Coleman Agitador Multifuncional TS-2000A VDRL Kline, Santo André, São Paulo, BR). Logo, a membrana foi novamente lavada com PBS-T e acrescido anticorpo IgG anti-gato 1:5000 por 1 h também em sob agitação. Após quatro lavagens com PBS-T, a membrana foi embebida com solução de revelação imunoenzimática (6 mg de DAB; 9 ml de TRIS HCL 50 mM pH 7,4-7,6; 1 ml de NiSO₄ 0,3%; 15 µl de H₂O₂) por dois minutos e lavada novamente com água destilada a fim de parar a reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de produção do antígeno do isolado 59 de *Sporothrix spp.* foi bem sucedido. Através do método de Bradford (1976), a concentração do exoantígeno foi de 366 ng/µl. Ao fim da técnica de SDS-PAGE foram visualizadas bandas proteínas mais proeminentes entre 40 a 100 kDa (Figura 1a) condizendo com o encontrado por Mendonza et al., (2002) e Almeida-Paes et al., (2007).

No entanto, ao avaliar a caracterização do exoantígeno através da técnica de *Western blot*, os resultados não foram evidentes. Por mais que apresente tamanho de bandas conforme encontradas anteriormente, o reconhecimento pelo pool de soros de felinos acometidos por esporotricose foi discreta (Figura 1b). Este resultado gerou um questionamento se houve perda dos epítomos imunogênicos do exoantígeno ou se a reação é fundamentalmente baixa. Em um breve teste-piloto com exoantígeno do isolado 59 como antígeno em ELISA, os resultados também não foram satisfatórios.

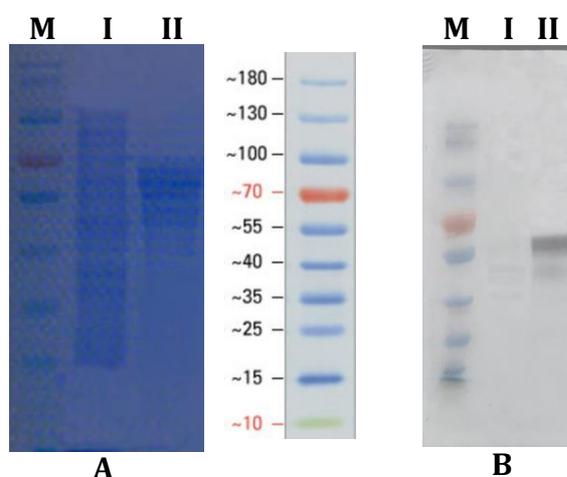


Figura 1: A - SDS-PAGE 12% do exoantígeno do isolado 59 de *Sporothrix spp.* B – Western blot para caracterização do exoantígeno. Legenda: M - Marcador de peso molecular (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder), I – Isolado 59 II – Controle positivo quimera recombinante.

Neste trabalho, foi possível a obtenção do exoantígeno da forma micelial do isolado 59 de *Sporothrix spp* e foi reconhecida discretamente pelos anticorpos IgG presentes no soro de felinos infectados. Contudo, para que seja viável as utilizações desses antígenos em ensaios de diagnóstico são necessárias mais estudos utilizando cepas tanto da região do Rio Grande do Sul, como de regiões endêmicas de outros estados do Brasil.

4. CONCLUSÕES

A produção do exoantígeno proveniente de um isolado de *Sporothrix spp* foi satisfatória no que tange a identificação das bandas proteicas através da técnica de SDS-PAGE. No entanto, ainda são necessárias adaptações do protocolo de extração para aprimorar o reconhecimento do exoantígeno da forma micelial, e respectivamente, o reconhecimento das proteínas de interesse pelos anticorpos presentes no soro de felinos acometidos por esporotricose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-PAES, R. et al. Use of Mycelial-Phase *Sporothrix schenckii* Exoantigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Sporotrichosis by Antibody Detection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 3, p. 244–249, mar. 2007.

ALVARADO, P. et al. Diagnóstico serológico de la esporotricosis mediante el empleo del antígeno de micelio de *Sporothrix schenckii* sensu stricto. **Investigación Clínica**, v. 56, n. 2, p. 111–122, jun. 2015.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 43, n. 6, p. 487–493, 1 set. 2005.

CROTHERS, S. L. et al. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987–2007). **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 4, p. 249–259, 2009.

DALIS, J. S. et al. Severe generalized skin lesions due to mixed infection with *Sporothrix schenckii* and *Dermatophilus congolensis* in a bull from Jos, Nigeria. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 3, p. 475–478, 27 ago. 2014.

FERNANDES, G. F. et al. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 3, p. 445–449, 27 jan. 2011.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 107–124, 29 set. 2020.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Medical mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 504–504, dez. 1992.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J.A. et al. Analysis of Some Immunogenic Properties of the Recombinant *Sporothrix schenckii* Gp70 Expressed in *Escherichia Coli*. **Future Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 397-410, 2019.

MENDOZA, M. et al. Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. **Medical Mycology**, v. 40, n. 5, p. 447-454, 2002.

RAMÍREZ-SOTO, M. C. et al. Ecological Determinants of Sporotrichosis Etiological Agents. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 95, 12 ago. 2018.