

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS NATIVOS DE LEVEDURAS DE *Sporothrix brasiliensis*

SIMONE ZARICHTA RAKULOSKI¹; ATHENA CRISTINA DE AZAMBUJA
RODRIGUES²; TATIÉLEN HERNANDEZ SEVERO³; DÉBORA MATILDE DE
ALMEIDA⁴; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁵; SÉRGIO JORGE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – szarichtarakuloski@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – athenacris@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – tatihsevero@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – deby.almeida@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – sergiojorgevet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix* spp., amplamente distribuídos em todo o mundo, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais (Reznik, 2022). Esses fungos são classificados como dimórficos, apresentando forma filamentosa quando em temperaturas entre 25°C a 30°C, e forma leveduriforme quando em temperatura de 37°C. Sua forma filamentosa é caracterizada por uma coloração branca no início do crescimento das colônias, que vai adquirindo tons de marrom a preto à medida que vai crescendo, já sua forma leveduriforme apresenta coloração bege e de aspecto cremoso (Leite, 2022).

Essa infecção é considerada uma zoonose de grande importância na saúde pública, afetando uma variedade de espécies, incluindo humanos e animais domésticos, como cães e gatos, sendo os felinos domésticos particularmente suscetíveis a formas clínicas graves da doença (Gremião *et al.* 2020; Ramirez-Soto *et al.* 2018). A transmissão ocorre frequentemente através da inoculação traumática do fungo no tecido subcutâneo do hospedeiro, seja por meio de contato com materiais contaminados, como espinhos e farpas, ou por meio de mordidas e arranhões de gatos infectados. No Brasil, a espécie *Sporothrix brasiliensis* tem emergido como a mais patogênica em felinos domésticos, sendo responsável por surtos de esporotricose zoonótica, particularmente em áreas urbanas do Rio Grande do Sul (Rodrigues *et al.* 2013; Gremião *et al.* 2020).

O diagnóstico da esporotricose tradicionalmente envolve o isolamento e a caracterização do fungo através de cultura micológica, porém métodos sorológicos, como o teste de ELISA utilizando proteínas recombinantes, têm mostrado alta sensibilidade e especificidade, proporcionando uma alternativa mais rápida e eficiente para o diagnóstico (Almeida-Paes *et al.* 2007; Alvarado *et al.* 2015). Para ensaios de diagnóstico indireto, uso de extratos brutos de *Sporothrix* spp., tem sido investigado, mostrando potencial antigênico, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas. Desse modo, este trabalho tem como objetivo realizar a extração de antígenos nativos de *S. brasiliensis* na sua forma leveduriforme e avaliar a capacidade de reconhecimento serem reconhecidos por anticorpos IgG presentes no soro de felinos naturalmente infectados, contribuindo para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas.

2. METODOLOGIA

O método utilizado para extração dos antígenos, foi adaptado a partir de um protocolo que consiste na maceração das amostras e adição de nitrogênio líquido (Rodrigues *et al.* 2015). As cepas utilizadas para produção dos extratos proteicos foram extraídas a partir de duas amostras de *Sporothrix brasiliensis*, sendo elas: LM20, cedida pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, e MG10, cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular e Micologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As cepas foram previamente identificadas por suas características macro, micromorfológicas e PCR. Inicialmente, as amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud, utilizando uma alça de platina estéril, e incubadas em estufa a 37°C por um período de sete dias, permitindo o crescimento das leveduras. Após esse período, as colônias formadas foram transferidas para Erlenmeyers contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI). As culturas foram mantidas em uma incubadora Shaker a 37°C a 180 rpm por mais sete dias.

Após esse tempo de incubação, as culturas foram centrifugadas a 3.600 rpm, a 6°C, por 30 minutos. Os pellets resultantes foram lavados três vezes com água ultrapura tipo 1 (Milli-Q) para remover qualquer resíduo do meio de cultura. Em cada lavagem, foi adicionado 1 mL de água, seguido de agitação em vórtex e nova centrifugação por 10 minutos. Após a última lavagem, o pellet foi submetido à maceração mecânica em almofariz, com adição gradual de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Este pó foi diluído em 4 mL de Tris-Ca²⁺ (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, CaCl₂ 2 mM). Em seguida, o extrato diluído foi transferido para microtubos contendo aproximadamente 0,1 mL de esferas de vidro (Sigma 600 µm) para 1,5 mL de extrato. A mistura foi vigorosamente agitada em vórtex por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, os detritos celulares e as esferas de vidro foram removidos por centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido para novos microtubos de 2 mL, com a adição de 40 µL de ditiotretitol (20 mM) em cada tubo.

Posteriormente, os antígenos extraídos foram concentrados utilizando uma membrana de diálise porosa e açúcar refinado como agente osmótico. A técnica consiste em adicionar 3,7 mL do extrato em cada 3 cm de membrana, amarrando as extremidades. Em seguida, a membrana é lavada com água destilada, e o peso inicial é registrado. A membrana contendo o extrato é então imersa em açúcar, cobrindo completamente sua superfície, e deixada em contato por cerca de 5 minutos. Em cada intervalo de tempo a membrana é lavada e pesada novamente para monitorar o nível de concentração, evitando a precipitação das proteínas. Foi alcançada uma concentração de 50% do peso inicial.

As proteínas extraídas foram caracterizadas através das técnicas de SDS-PAGE e Western Blot, para isso foram preparados dois géis idênticos de SDS-PAGE a 12%, em que foram adicionadas as amostras LM20 e MG10, após tratamento térmico para desnaturação das proteínas. Foi utilizado também, um marcador molecular e, como controle, foram utilizadas as proteínas recombinantes 1 e 2, previamente testadas. A eletroforese foi realizada com uma tensão inicial de 80V por 25 minutos, seguida de um aumento para 120V por aproximadamente 1h30. Após, um dos géis foi corado Coomassie Brilliant Blue (CBB) e aquecido por 30 segundos no micro-ondas. O segundo gel foi submetido a técnica de Western Blot, sendo transferido para uma membrana de nitrocelulose, bloqueado com tampão de bloqueio 5% (leite em pó desnatado e PBS-T) durante a noite, em câmara fria. Incubado com um pool de soros

de felinos com diagnóstico confirmado de esporotricose e com anticorpo secundário IgG anti-cat. Por fim, a membrana foi embebida com solução de revelação imunoenzimática por dois minutos e lavada com água destilada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do gel de eletroforese SDS-Page 12% foi feita utilizando um equipamento de transluminescência branca, que facilita a visualização das bandas. Nas proteínas controle (Quimera 1 e 2), é possível observar uma banda em destaque em relação as demais. Essas bandas de coloração mais escura, condizem com pesos moleculares entre 55 e 70 kDa, determinados anteriormente. Por outro lado, as proteínas extraídas, LM20 e MG10, não apresentaram bandas com destaque significativo em relação as demais, mas ainda assim é possível visualizar proteínas de diferentes pesos moleculares. Também é possível observar que as duas amostras apresentaram bandas proteicas semelhantes, em que as mais relevantes tiveram seus valores variando de 100, 80 e 40 kDa, apesar de serem oriundas de diferentes regiões do país (Figura 1).

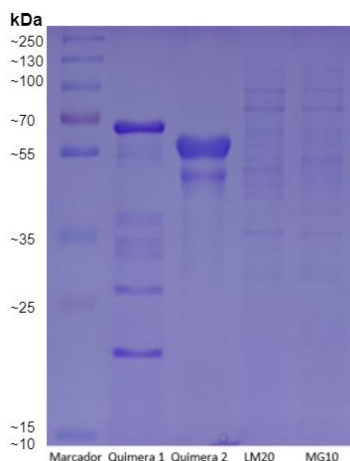


Figura 1: SDS-Page 12% com pesos moleculares das proteínas extraídas

No que diz respeito ao Western Blot, embora o resultado das exoproteínas não seja tão notável quanto o das proteínas recombinantes, é possível afirmar que as proteínas das cepas LM20 e MG10, quando expostas a soros de felinos positivos para esporotricose são capazes de ser reconhecidas pelos mesmos, demonstrando assim sua capacidade antigênica, como pode ser observado na figura 2.

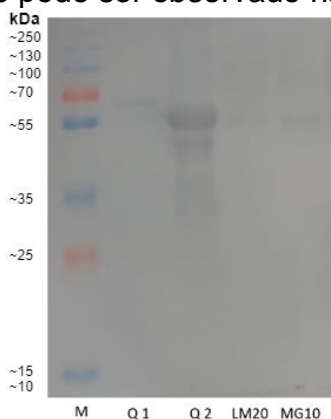


Figura 2: Western Blot da caracterização das exoproteínas LM20 e MG10.

A principal banda proteica dos extratos brutos reconhecida pelos soros apresentou valores de aproximadamente 55 kDa. Estes resultados sugerem que estas proteínas desempenham papéis importantes no reconhecimento do fungo pelos anticorpos IgG presentes no soro dos gatos naturalmente infectados, no entanto, são necessários mais estudos para caracterizar e padronizar o uso dessas proteínas como nova ferramenta no controle da esporotricose.

4. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares deste estudo, indicam que os anticorpos IgG presentes nos soros de gatos positivos para esporotricose reconhecem os antígenos nativos de diferentes isolados de *S. brasiliensis* extraídas através do protocolo descrito. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar o potencial uso dessas proteínas em ensaios de diagnósticos sorológicos.

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. Serological diagnosis of sporotrichosis using an antigen of *Sporothrix schenckii* sensu stricto mycelium. **Invest. clín.** v. 56, n. 2, p. 111-122, jun. 2015.

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, 2021.

LEITE, Maria Natália Gomes. **Caracterização microbiológica e molecular de *Sporothrix* spp. isolados de felinos**. Orientadora: Adriana Fiorini Rosado. 2022. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2022.

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

REZNIK, Alec Utida. **Esporotricose felina**. Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado. 2022. 21f. Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária - Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2022.

RODRIGUES A. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1-14, e2281, jun. 2013.

RODRIGUES, A. M. et al. Two-dimensional gel electrophoresis data for proteomic profiling of *Sporothrix* yeast cells. **Data in brief**, v. 2, p. 32-38, 2015.