VII EAITI 2017 ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA | 09 e 10 de novembro de 2017

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA CORISMATO SINTASE DE *P. BRASILIENSIS* COM FOCO NO DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA PREVENÇÃO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Amanda Sayuri Moreira Watanabe (PIBITI/CNPq – Fundação Araucária/UEM), Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador), eskioshima@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá (UEM) / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina (DAB)

Microbiologia / Microbiologia Aplicada
Palavras Chave: *paracoccidioidomicose, Corismato sintase, proteína recombinante.*

Resumo

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de caráter granulomatoso tendo como agente etiológico fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. Pacientes com PCM necessitam de tratamento prolongados com antifúngicos. Porém, as opções terapêuticas são limitadas e recidivas são frequentes. Com advento das proteínas recombinantes, a obtenção e caracterização de possíveis candidatos à vacina tornou-se realidade. O objetivo do presente trabalho foi otimizar a produção da Corismato sintase de *P. brasiliensis* recombinante (PbCSr) com intuito de melhor caracterizá-la, com foco no desenvolvimento de novas opções terapêuticas e sua aplicação em vacina contra PCM.

Introdução

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de caráter granulomatoso, restrita a América Latina, e tem como agentes etiológicos o genero *Paracoccidioides spp.* Recentemente, o nosso laboratório tem trabalhado na produção da Corismato sintase de *P. brasiliensis* recombinante (*Pb*CSr) com intuito de melhor caracterizá-la, com foco no desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Material e Métodos

Otimização da expressão heteróloga de PbCSr
Utilizou-se a cepa *E. coli* BL21 (DE3) para realização da indução em pequena escala (IPE). As condições utilizadas foram, 37°C, 220 RPM, em tempos de 0 a 6 horas e Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) em uma concentração de 1 mM e 1,5 mM. Para otimização, comparou-se a expressão heteróloga em meio Luria – Bertani (LB) caldo e meio Terrific Broth (TB) caldo.

Imunogenicidade e proteção em camundongos
Os camundongos foram separados em dois: imunizados com emulsão do adjuvante com a *Pb*CSr, com 7,5 μg de *Pb*CSr por animal (CS) e controle que recebeu apenas o adjuvante com tampão Tris-HCL (Ct). Aproximadamente 500 μL de sangue por animal foi retirado antes de cada imunização para obtenção do soro e posterior análise. A análise sorológica foi realizada por meio da técnica de ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Resultados Obtidos

A utilização dos meios testados LB e TB permitiram bons rendimentos, sendo a expressão de *Pb*CSr em meio TB apresentou melhores rendimentos. Definiu-se as condições ótimas de expressão de *Pb*CSr como sendo o meio TB, a 37°C, 4 horas e 1,5 mM de IPTG, demonstrando resultado positivo na expressão da proteína (Figura 1). Observou-se durante a leitura dos testes que os camundongos imunizados com a proteína apresentaram crescentes níveis séricos de IgG durante a primeira e segunda imunização, de 0,484 para 0,786, quando comparados ao grupo controle não imunizado, de 0,055 para 0,128, demonstrando que a *Pb*CSr foi capaz de induzir uma resposta imunológica com produção de anticorpos (Figura 2).

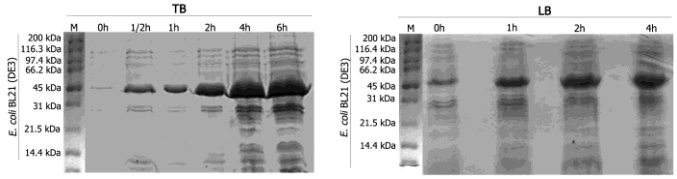


Figura 1. Análise da expressão de PbCSr por SDS-PAGE em meio LB (Luria –Bertani). *Pb*CSr é representada pela banda 45 kDa. Observa-se aumento gradativo da expressão ao longo dos tempos analisados e uma melhor expressão em meio TB no tempo de 4 horas.

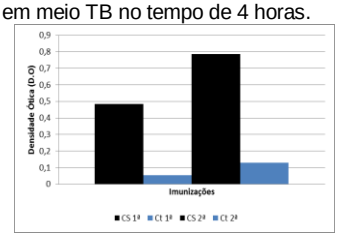


Figura 2. Observam-se os resultados da resposta de anticorpos induzida pela imunização com *Pb*CSr. CS 1ª (preto) após 2 semanas da primeira imunização. Ct ª (azul) soro controle após 2 semanas com a aplicação de Tris-HCL. CS 2ª (preto) após 4 semanas com 2 imunizações com intervalo de 15 dias. Ct 2ª (azul) animais sem aplicação de *Pb*CSr,com aplicação de tampão Tris-HCL.

Conclusão

Quantidade suficientes desta proteína purificada foram obtidas e os crescentes títulos de imunoglobulina G (IgG) frente as imunizações com a proteína recombinante Corismato sintase (*Pb*CSr), demonstra a capacidade promissora da proteína em questão. No entanto, ainda é necessário avaliar se a resposta imune desecadeada é protetora contra PCM.

Agradecimentos

Ao CNPq e a Fundação Araucária por possibilitarem a realização do presente projeto.

[1] Travassos, LR & Taborda, CP. New advances in the development of a vaccine against paracoccidioidomycosis. Front Microbiol. **2012**.