



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

PAULO ARTHUR COUTINHO

**Caracterização bioquímica e estrutural da proteína Fator
Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) como potencial
alvo para fármacos contra Paracoccidioidomicose**

VITÓRIA, ES

2020

Paulo Arthur Coutinho

**Caracterização bioquímica e estrutural da proteína Fator Inibidor da Migração
de Macrófagos (MIF) como potencial alvo para fármacos contra
Paracoccidiodomicose**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia (PPGBF), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Barbosa Coitinho
Gonçalves

Coorientadora: Profa. Dra. Viviane Cristina
Fernandes dos Santos

VITÓRIA, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C871c Coutinho, Paulo Arthur, 1996-
Caracterização bioquímica e estrutural da proteína Fator
Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) como potencial alvo
para fármacos contra Paracoccidiodomicose / Paulo Arthur
Coutinho. - 2020.
78 f. : il.

Orientadora: Juliana Barbosa Coitinho.
Coorientadora: Viviane Cristina Fernandes.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Paracoccidídeos. 2. Paracoccidiodomicose. 3. Fator
Inibidor da Migração de Macrófagos. 4. Expressão heteróloga. 5.
Caracterização bioquímica. I. Barbosa Coitinho, Juliana. II.
Fernandes, Viviane Cristina. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

PAULO ARTHUR COUTINHO

Caracterização bioquímica e estrutural da proteína Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) como potencial alvo para fármacos contra Paracoccidiodomicose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves
Universidade Federal do Espírito Santo, PPGBF
Orientadora

Dra. Viviane Cristina Fernandes dos Santos
Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz MG
Coorientadora

Prof. Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende
Universidade Federal do Espírito Santo, PPGBF

Prof. Dr. Renato Graciano de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado

Aos quatorze dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, por webconferência, os membros da banca examinadora, Prof^ª. Dr^ª. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves, orientadora, Dr^ª. Viviane Cristina Fernandes dos Santos, coorientadora, Prof. Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende e Prof. Dr. Renato Graciano de Paula, reuniram-se para apreciação da dissertação de mestrado intitulada **“Caracterização bioquímica e estrutural da proteína Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) como potencial alvo para fármacos contra Paracoccidiodomicose”**, de autoria do(a) candidato(a) **Paulo Arthur Coutinho**, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o(a) candidato(a) foi **APROVADO** pela Comissão Examinadora. Foi concedido um prazo de sessenta dias, para o(a) candidato(a) efetuar as correções impostas pela Comissão Examinadora e apresentar o trabalho em sua redação definitiva, em quatro vias impressas e uma digital, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata e vai assinada pelos membros da Comissão.

Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves - Orientadora

Viviane Cristina Fernandes dos Santos

Dr^ª. Viviane Cristina Fernandes dos Santos - Coorientadora

Lucas Cunha Dias de Rezende

Prof. Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende - Examinador Interno

Renato Graciano de Paula

Prof. Dr. Renato Graciano de Paula - Examinador Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais essa jornada concluída. Pela Universidade Federal do Espírito Santo por permitir o meu crescimento acadêmico e as agências de fomento CAPES e FAPES.

Agradeço também ao Programa de Pós graduação em Bioquímica, pela oportunidade e pelas portas que foram abertas. A minha orientadora Juliana, que sempre acreditou e insistiu no meu potencial, mesmo eu sendo um pouco complicado. Aos seus puxões de orelha, críticas construtivas, e até mesmo o conforto de um abraço nos momentos mais difíceis. Aos professores integrantes da Banca, e por todos os outros professores envolvidos que acreditaram na minha capacidade, e que agora fazem parte da minha história.

Agradeço a toda a minha família, que sempre me apoiou de todas as formas. Meu pai e minha mãe que sempre lutaram muito e me ajudaram para que eu pudesse chegar aonde cheguei. Minha irmã, melhor amiga e confidente, que sempre tive um ombro amigo e muita ajuda. A minha avó, Franciele, Bruno e Bruna, por estarem ao meu lado nessa jornada.

Por último, mas não menos importante, todos meus amigos, que estiveram presentes nessa minha fase da vida e vivenciaram todas as minhas dificuldades. Aos meus melhores amigos Lucas, Nicholas, Bernardo, Stephanie, Nathalia, Giuliana e Izabelle que sempre se dispuseram a me ajudar, independente de tudo.

A minha melhor amiga Jessica, que deixou muitas saudades, mas sempre acreditou em mim! Sua presença em meu coração, sempre foi capaz de me dar forças para continuar lutando mesmo de longe.

Meus amigos de turma, por me tolerarem mesmo nos meus piores dias. A Sarah, Tamara, Marielly, Estela, Ariel, Matheus, Fabiano e Dayane que sempre me encorajaram e me ajudaram muito, não me deixando desistir! Agradeço também a minha amiga de curso Vanessa, por sempre me estimular e estar ao meu lado a todo momento. A minha amiga de trabalho Lediani, que sempre me incentivou no meu pior momento dessa jornada.

De certa forma, a todas as outras pessoas que passaram pela minha vida nesse período, pois me fizeram crescer e aprender, tornando-se parte desse momento. Muito Obrigado a todos!

RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica da América Latina, com uma grande incidência no Brasil e com casos relatados no Espírito Santo. Essa doença, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, afeta os pulmões e outros órgãos e pode ser fatal se o tratamento correto não for empregado. O tratamento da PCM é realizado com antifúngicos tradicionais, sendo seu custo muito alto e prolongado. A proteína MIF (fator inibidor da migração de macrófagos), que, em helmintos, parece facilitar o estabelecimento da infecção, não apresenta estrutura tridimensional resolvida em *Paracoccidioides* e sua sequência primária diverge de outras proteínas MIF. Inicialmente, para a escolha da MIF como objeto de estudo, os servidores XtalPred, ExPasy e BlastP foram utilizados e demonstraram ser a MIF um bom alvo para caracterização bioquímica-estrutural. Além disso, a estrutura secundária e terciária da MIF foi predita pelos servidores ESPrit, PsiPred e i-TASSER, demonstrando que sua estrutura global predita concorda com MIF de outros organismos, mas apresenta diferenças importantes para a MIF de humanos que podem ser exploradas num contexto de tratamento da PCM. Dessa forma, a região codificadora para MIF foi clonada no vetor pET-28aTEV. O vetor recombinante foi inserido nas cepas de *Escherichia coli* BL21, ArcticExpress, Rosetta, Lemo21 e C43. Vários testes de expressão variando concentração de indutor, temperatura e tempo de indução e uso de diferentes aditivos foram realizados, além de diferentes protocolos de lise com o intuito de obter a proteína MIF na fração solúvel. Assim, a proteína recombinante foi expressa na fração solúvel somente da cepa de *E. coli* Rosetta com indução a 18 °C por 72 horas e 1 mmol.L⁻¹ de IPTG com adição de etanol 1% (v.v⁻¹) e foi purificada por cromatografia de afinidade ao cobalto. Todos os esforços para purificação da MIF a partir da fração solúvel se justificam por esse passo ser essencial para sua caracterização bioquímica-estrutural, o que certamente contribuirá para o desenvolvimento de fármacos mais efetivos para o tratamento, assim como uma alternativa de diagnóstico mais eficiente.

PALAVRAS-CHAVE: Paracoccidioides, Paracoccidioidomicose, PCM, Fator Inibidor da Migração de Macrófagos, MIF.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic systemic mycosis in Latin America, with a high incidence in Brazil and with cases reported in Espírito Santo. This disease, caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*, affects the lungs and other organs and can be lethal if the correct treatment is not used. The treatment of PCM is carried out with traditional antifungals, and its cost is extremely high and prolonged. The MIF protein (macrophage migration inhibiting factor), which, in helminths, seems to facilitate the establishment of infection, does not have a three-dimensional structure resolved in *Paracoccidioides* and its primary sequence differs from other MIF proteins. Initially, to choose MIF as the object of study, the servers XtalPred, Expasy and BlastP were used and demonstrated that MIF is a good target for biochemical-structural characterization. In addition, the secondary and tertiary structure of the MIF was predicted by the servers ESPrit, PsiPred and i-TASSER, demonstrating that its predicted global structure agrees with the MIF of other organisms, but presents important differences for the FIM of humans that can be explored in a context treatment of PCM. Thus, the coding region for MIF was cloned into the vector pET-28aTEV. The recombinant vector was inserted in the strains of *Escherichia coli* BL21, ArcticExpress, Rosetta, Lemo21 and C43. Several expression tests varying inducer concentration, temperature and induction time and use of different additives were carried out, in addition to different lysis protocols in order to obtain the MIF protein in the soluble fraction. Thus, the recombinant protein was expressed in the soluble fraction only of the *E. coli* Rosetta strain with induction at 18 ° C for 72 hours and 1 mmol.L⁻¹ of IPTG with addition of 1% ethanol (v.v⁻¹) and was purified by cobalt affinity chromatography. All efforts to purify MIF from the soluble fraction are justified because this step is essential for its biochemical-structural characterization, which will certainly contribute to the development of more effective drugs for treatment, as well as a more efficient diagnostic alternative.

KEYWORDS: *Paracoccidioides*, Paracoccidioidomycosis, PCM, Macrophage Migration Inhibitory Factor, MIF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa das regiões endêmicas da PCM com o grau de incidência nos anos de 2012 e 2017.	04
Figura 2. Estrutura química de antifúngicos tradicionais.	07
Figura 3. O fungo dimórfico <i>Paracoccidioides</i>	09
Figura 4. Ciclo de vida do fungo do gênero <i>Paracoccidioides</i>	10
Figura 5. Reação de tautomerase	12
Figura 6. Estrutura tridimensional da MIF humana.	12
Figura 7. Desenho esquemático do vetor pET28a(TEV) – 5369 pb.	17
Figura 8. Resultado apresentado pelo servidor XtalPred para a proteína MIF.	29
Figura 9. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína MIF utilizando o servidor BLASTx.	30
Figura 10. Alinhamento no Blastx mostrando a identificação de um domínio conservado.	32
Figura 11. Alinhamento da sequência primária de MIF de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e humana.	32
Figura 12. Análise comparativa das estruturas secundárias da MIF humana (MIF-H) e da MIF de <i>Paracoccidioides</i> (MIF-P).	33
Figura 13. Modelo tridimensional predito para a MIF de <i>Paracoccidioides</i> através do servidor I-TASSER.	36
Figura 14. Alinhamento estrutural entre o modelo predito para a MIF de <i>Paracoccidioides</i>	38
Figura 15. Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas MIF de <i>Paracoccidioides</i> (MIF-P), de <i>Oncomelania hupensis</i> (6LKV), de <i>Plasmodium yoelii</i> (3GAC) e humana (1GCZ).	39
Figura 16 . SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise de MIF em <i>E. coli</i> BL21(DE3).	40
Figura 17. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 24 horas e lise de MIF em <i>E. coli</i> BL21(DE3).	42
Figura 18. <i>Western blot</i> da expressão heteróloga com indução por 24 horas de MIF em <i>E. coli</i> BL21(DE3).	43

Figura 19. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Ni ²⁺ com renaturação em coluna de MIF expressa em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	44
Figura 20. SDS-PAGE 15 % da concentração da fração insolúvel de MIF em <i>E. coli</i> BL21(DE3) após cromatografia de afinidade.....	45
Figura 21. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Ni ²⁺ de MIF em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	45
Figura 22. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 24 horas e lise de MIF em <i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3)	47
Figura 23. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Ni ²⁺ de MIF em <i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3) (extrato solúvel).....	48
Figura 24. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 72 horas e lise do MIF em <i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3)	49
Figura 25. Western blot da expressão heteróloga a 72 horas de MIF em <i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3).....	50
Figura 26. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Ni ²⁺ de MIF em <i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3).	51
Figura 27. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise de MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3).....	52
Figura 28. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise de MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3).....	52
Figura 29. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 24 horas e lise do MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3).....	53
Figura 30. Western blot da expressão heteróloga a 24 horas do MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3).....	54
Figura 31. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Co ²⁺ do MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3).....	55
Figura 32. Imagem da precipitação da amostra insolúvel da cepa Rosetta(DE3) após diálise para retirada do imidazol.....	56
Figura 33. Reatividade de IgG humana à MIF.....	57
Figura 34. SDS-PAGE 15 % da diálise do MIF insolúvel em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3). .	58
Figura 35. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise do MIF em <i>E. coli</i> C43(DE3)pLysS.....	59
Figura 36. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 18 horas e lise do MIF em <i>E. coli</i> C43(DE3)pLysS.....	60

Figura 37. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 18 horas e lise de MIF em <i>E. coli</i> Lemo21(DE3).	61
Figura 38. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise de MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3).	62
Figura 39. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 24 horas e lise de MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3) com etanol 1 %.	63
Figura 40. <i>Western blot</i> da expressão heteróloga a 24 horas de MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3) com etanol 1 %.	64
Figura 41. Imagem da membrana de PVDF, utilizada para <i>Western blot</i> , corada com Ponceau da expressão heteróloga a 24 horas do MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3) com etanol 1 %.	65
Figura 42. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 72 horas e lise de MIF em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3) com etanol 1 % corado com nitrato de prata.....	66
Figura 43. SDS-PAGE 15 % da purificação de MIF por cromatografia de afinidade ao cobalto corado com nitrato de prata.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros da proteína MIF obtidos pelo servidor Expasy.....	29
Tabela 2. Resultado do alinhamento estrutural entre o modelo previsto pelo I-TASSER para a MIF de <i>Paracoccidioides</i> (MIF-P) e as proteínas com estruturas conhecidas depositadas no PDB.....	37
Tabela 3. Resumo dos testes de expressão realizados neste trabalho e o resultado final obtido.....	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequência de aminoácidos da proteína MIF..	16
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AmB: Anfotericina B

BIOEST: Laboratório de Biologia Estrutural

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

LABIOM: Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares

LB - Luria-Bertani

MIF – Fator Inibidor da Migração de Macrófagos

PCM – Paracoccidiodomicose

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

MIF-P – MIF de Paracoccidíoides

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

PABA - Ácido p-aminobenzóico

0H - Amostra antes da indução com IPTG

4H - Amostra após 4 horas de indução com IPTG

24H - Amostra após 24 horas de indução com IPTG

72H – Amostra após 72 horas de indução com IPTG

MM – Marcador Molecular

I/ INS - Fração (amostra) insolúvel

S/ SOL – Fração (amostra) solúvel

LBBMP – Laboratório de Biofísica e Biologia Molecular de Proteínas

IgG – Imunoglobulina G

AP – Aplicação da Amostra

LV - Lavagem

E - Eluição

Ni²⁺ - Níquel

Anti-His – Anticorpo anti calda de histidina

mRNA – RNA mensageiro

MIF-P – MIF de Paracoccidioides

MIF-H – MIF de Humanos

Co²⁺ - Cobalto

PEG - Polietilenoglicol

Sumário

1-	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2-	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1-	Paracoccidiodomicose	3
2.2-	Fungos do gênero Paracoccidioides	8
2.3-	Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF)	11
3-	OBJETIVOS	15
3.1-	Geral	15
3.2-	Específicos	15
4-	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1-	Análises <i>in silico</i> e clonagem da sequência codificadora de MIF.....	16
4.2-	Expressão heteróloga.....	18
4.2.1-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	18
4.2.2-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> Arctic Express(DE3).....	18
4.2.3-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3)	19
4.2.4-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> C43(DE3) pLysS.....	19
4.2.5-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> Lemo(DE3)	20
4.2.6-	Expressão com adição de etanol.....	20
4.3-	Lise Bacteriana	21
4.4-	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	22
4.5-	Purificação da proteína recombinante por cromatografia por afinidade a partir do extrato insolúvel.....	23
4.6-	Purificação da proteína recombinante por cromatografia por afinidade a partir do extrato solúvel.....	24
4.7-	Diálise e concentração da proteína recombinante.....	25
4.8-	Western Blot.....	25
4.9-	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	26
5.1-	Análises <i>in silico</i> da proteína MIF	28
5.2-	Expressão heteróloga.....	40
5.2.1-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	40
5.2.2-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> ArcticExpress(DE3).....	45
5.2.3-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3)	50
5.2.4-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> C43(DE3)pLysS.....	58
5.2.5-	Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> Lemo21(DE3).....	60
6-	CONCLUSÕES.....	69

7- PERSPECTIVAS	70
8- BIBLIOGRAFIA.....	71
APÊNDICE	77

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa sistêmica causada pelos fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides* e que afeta diferentes órgãos, principalmente os pulmões (MENDES et al., 2017a).

A mudança morfológica em *Paracoccidioides* está diretamente relacionada à patogenicidade do fungo e é desencadeada pela mudança na temperatura do ambiente. No solo, em temperaturas próximas a 25 °C, o fungo está em sua fase micelial, onde produz conídios (esporos) que são inalados pelo hospedeiro para que ocorra a infecção. No hospedeiro, com elevação da temperatura para 37 °C (temperatura corporal) ocorre a mudança da fase de micélio para levedura, sendo a fase de levedura responsável pela patogenicidade do fungo (TAVARES et al., 2015a).

Após a inalação dos conídios, o fungo alcança os brônquios e alvéolos pulmonares de onde pode se espalhar para outros órgãos através das vias hematogênica e linfática (DE OLIVEIRA et al., 2015; RITA; FORTES; MIOT, 2011).

A PCM é uma doença endêmica de países da América Latina, estendendo-se do sul do México ao norte da Argentina, sendo mais prevalente no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina. O Brasil é o país mais afetado pela PCM com mais de 12 mil casos reportados (MARTINEZ, 2017).

O tratamento da PCM é feito com sulfonamidas, anfotericina B e azóis e possui duração de 1 ano ou mais para casos mais brandos e de 2 anos ou mais para casos moderados a graves. Além do longo tempo de tratamento, esses fármacos apresentam outros problemas associados como efeitos colaterais e o alto custo. Além disso, já são relatados diversos casos de resistência aos antifúngicos tradicionais, dessa forma, novos fármacos têm sido sugeridos na literatura, porém nenhuma delas está disponível no mercado.

Sendo assim, torna-se de suma importância a busca por novos fármacos ou alternativas. Neste contexto uma forma para a busca de novos alvos seria o desenho de medicamentos com base na estrutura tridimensional do alvo. Dessa forma, conhecimentos bioquímicos-estruturais de proteínas dos fungos do gênero *Paracoccidioides* podem contribuir para uma melhor caracterização da biologia

dessas espécies e sua interação com o hospedeiro, assim como no desenvolvimento de imunógenos para o diagnóstico e tratamento (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014a).

A proteína MIF (fator inibidor da migração de macrófagos) é forte candidata para esse propósito. Esta proteína é bastante conservada, apresentando homólogos em mamíferos, galinha, peixes mandibulados e não mandibulados, carrapatos, plantas, cianobactérias e parasitas, sendo que esta conservação pode indicar que MIF desempenhe funções biológicas importantes (CALANDRA et al., 1995). Foi descrito, por exemplo, que helmintos são capazes de secretar MIF no local da infecção induzindo a produção endógena adicional de MIF do hospedeiro, criando um ambiente anti-inflamatório local que facilita o crescimento e sobrevivência do parasita (CALANDRA et al., 1995; SHAO et al., 2008; VERMEIRE et al., 2008).

Em vista dos argumentos apresentados a respeito do tratamento contra a PCM, a pesquisa por agentes quimioterápicos mais efetivos e específicos contra o fungo com pouco ou nenhum efeito colateral é de suma importância. Nesse contexto, a proteína MIF de *Paracoccidioides*, que possui suas funções e estrutura desconhecidas, um alvo interessante para estudos estruturais e funcionais.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa sistêmica causada por fungos termicamente dimórficos do gênero *Paracoccidioides* que pode afetar qualquer órgão, sendo os pulmões os mais afetados (MENDES et al., 2017a).

Esta doença é exclusiva de países da América Latina, estendendo-se do sul do México ao norte da Argentina, sendo mais prevalente no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina. A PCM é a segunda micose mais prevalente em toda a área endêmica (MARTINEZ, 2015; MENDES et al., 2017b; TABORDA et al., 2015), sendo as áreas agrícolas, úmidas, com alta pluviosidade e temperatura moderada mais favoráveis para o desenvolvimento e crescimento do fungo (MARTINEZ, 2017). Esta micose não possui notificação obrigatória no Brasil, o que torna uma variável e conseqüentemente uma dificuldade na determinação de áreas endêmicas, pois os registros de casos da doença nem sempre ocorrem (MARTINEZ, 2017; WANKE; AIDÉ, 2009)

Peçanha (2012) classificou as regiões endêmicas como de baixa, moderada e alta incidência (**Figura 1**). Martinez (2017) atualizou o mapa da região, classificando-a como de alta (primeiras áreas de endemia conhecidas e novas áreas), moderada crescente (novas áreas) e baixa endemia (antigas e novas áreas) (**Figura 1**). O aumento das áreas endêmicas de 2012 para 2017 reflete não somente a progressão

da doença, mas também, a maior preocupação em registrar e ter controle dos casos de PCM.

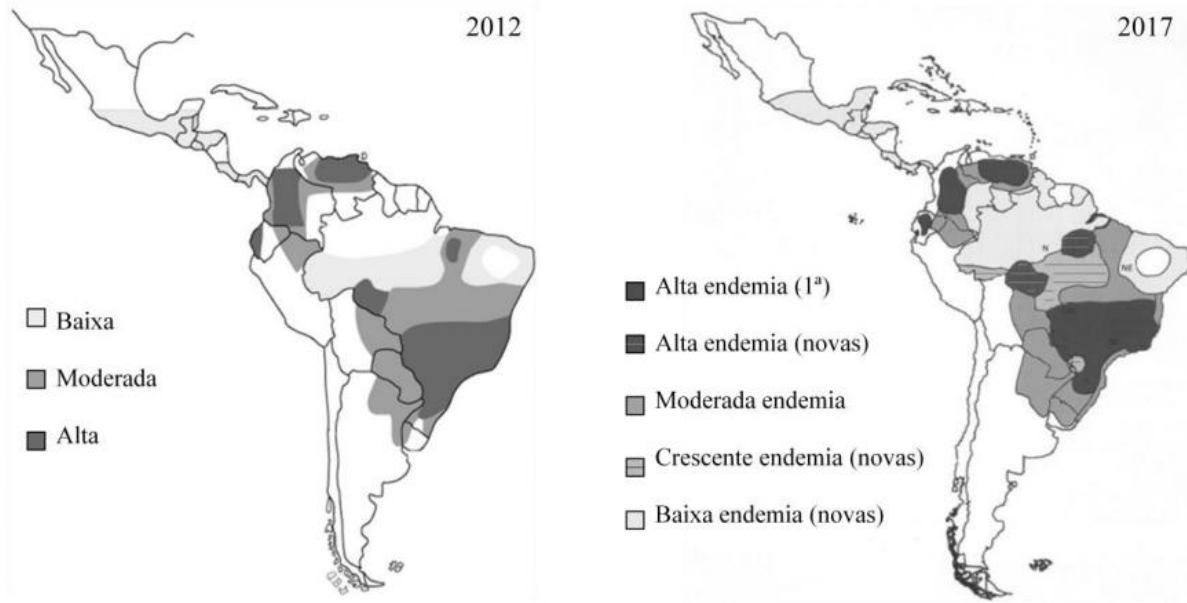


Figura 1. Mapa das regiões endêmicas da PCM com o grau de incidência nos anos de 2012 e 2017. O mapa de 2017 classifica as regiões de acordo com o grau de alta incidência (primeiras áreas de incidência conhecidas), alta incidência (novas áreas), moderada incidência, crescente incidência (novas áreas), baixa incidência (antigas e novas áreas) (MARTINEZ, 2017). Pode ser observado um aumento das áreas endêmicas da doença de 2012 para 2017.

Quanto à incidência da PCM no estado do Espírito Santo, esse estado apresentou 107 mortes por PCM, sendo a maior taxa de mortes por milhão de habitantes (2,92 mortes/milhão) em relação a outras regiões endêmicas da PCM (COUTINHO, Z. F., SILVA, 2002; MENDES PEÇANHA, 2012).

Um estudo com 546 pacientes diagnosticados com PCM, realizado no estado do Espírito Santo entre 1978 a 2012, mostrou que a maior prevalência da doença ocorreu nos municípios do interior do estado, com tradição de cultivo de café (PEÇANHA, 2012). Isso salienta que os indivíduos mais afetados pela PCM geralmente são do sexo masculino, trabalhadores de zonas rurais (geralmente a principal população em risco), fumantes, alcoólatras e pessoas com alguma outra doença crônica como imunodepressão (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; TAVARES et al., 2015b).

A paracoccidiodomicose pode se manifestar de diferentes formas, porém a classificação clínica da doença é dividida em dois tipos: crônica e aguda. Franco et al. (1987) propôs um novo meio de classificar as formas clínicas da PCM, que foi adaptada por Marques (2013). Esta forma de classificação divide a doença em quatro grupos, sendo o grupo 1 (PCM - infecção) compatível com pacientes sem sinais e sintomas da doença, mas que possuem diagnóstico positivo para teste cutâneo; o grupo 2 (PCM – doença), dividido em dois subgrupos, 2.1, que abrange a forma aguda/subaguda e, geralmente, acomete pacientes com idade inferior a 30 anos, com tropismo fúngico para linfonodos, fígado, baço e medula óssea e 2.2, forma crônica, que acomete adultos de maneira unifocal (acometimento de um órgão ou sistema) ou multifocal (forma mista, acometendo um ou mais órgãos e sistemas); o grupo 3, que constitui pacientes com PCM associada a imunossupressão e, por último, o grupo 4, que abrange pacientes com sequelas, especialmente DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica), estenose e obstrução da vias aéreas superiores e insuficiência adrenal.

O diagnóstico da PCM pode ser realizado de várias formas, que diferem tanto na técnica utilizada, quanto na fonte da amostra. O teste cutâneo é o método mais utilizado para detectar infecção assintomática do fungo (MARTINEZ, 2015). Já em casos sintomáticos, o diagnóstico micológico é realizado através da identificação do fungo (que possui uma morfologia distinta) em amostras biológicas como saliva fresca, lesões, aspirado de linfonodos ou fragmentos de biópsias. Este teste é o mais utilizado, sendo considerado o padrão ouro (LACAZ et al., 2002).

O teste histopatológico, que apresentou uma sensibilidade de 96,7 % em 239 amostras analisadas no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo (MORETO et al., 2011), é feito através da coloração do fungo em tecidos e esfregaços utilizando um reagente específico (GROCOTT, 1955)

Além disso, anticorpos anti-*Paracoccidioides* podem ser detectados em amostras de pacientes por técnicas sorológicas (BOTTEON et al., 2002). Vários antígenos de fungos do gênero *Paracoccidioides* vêm sendo estudados e apresentaram bons resultados em testes de diagnóstico e como adjuvantes no tratamento contra a PCM como, por exemplo, Gp43 (PUCCIA et al., 1986), PbHsp70 (DÍEZ et al., 2003), Pb27 e Pb40 (FERNANDES et al., 2011a, 2011b). Muitos desses

antígenos resultaram em testes de imunodiagnóstico com altos valores de sensibilidade e especificidade, mesmo em relação a outras micoses semelhantes. Apesar dessas altas taxas de sensibilidade e especificidade, as diferentes espécies de *Paracoccidioides* causadoras da PCM podem responder de formas diferentes quando o antígeno utilizado não é comum a todas as espécies. Essas proteínas também podem ser utilizadas para avaliar o progresso do tratamento, a recorrência da doença (MARQUES; LEITE; PAULO, 2012) e como adjuvante do tratamento (FERNANDES et al., 2011b).

Uma alternativa rápida para identificação do fungo sem a necessidade de cultura, são os métodos moleculares que são altamente sensíveis e específicos. A espécie *P. brasiliensis* foi identificada utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), através de iniciadores para sequencias específicas codificadoras de proteínas do fungo (GOLDANI; SUGAR, 1998; GOMES et al., 2000).

As técnicas de diagnóstico por imagem também são utilizadas uma vez que o pulmão é o órgão primário da infecção e o envolvimento pulmonar deve ser investigado em todos os casos. Porém, as imagens radiológicas da pneumonia podem ser semelhantes à de PCM (MARQUES; LEITE; PAULO, 2012).

O tratamento da PCM é feito com a administração de antifúngicos tradicionais (**Figura 2**) e, comumente, apresenta duração de mais de um ano, para casos leves e mais de dois anos para casos moderados. A terapia química com a utilização dos derivados de imidazol como cetoconazol, itraconazol, fluconazol e vericonazol, tem sido mais efetiva (MENDES et al., 2017b), agindo através da inibição da biossíntese de ergosterol, principal componente da membrana celular dos fungos e essencial para a mesma (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Porém, apresenta efeitos adversos como náuseas, erupções cutâneas, aumento de transaminases séricas, hipocalcemia, hipertrigliceridemia e hiperuricemia (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

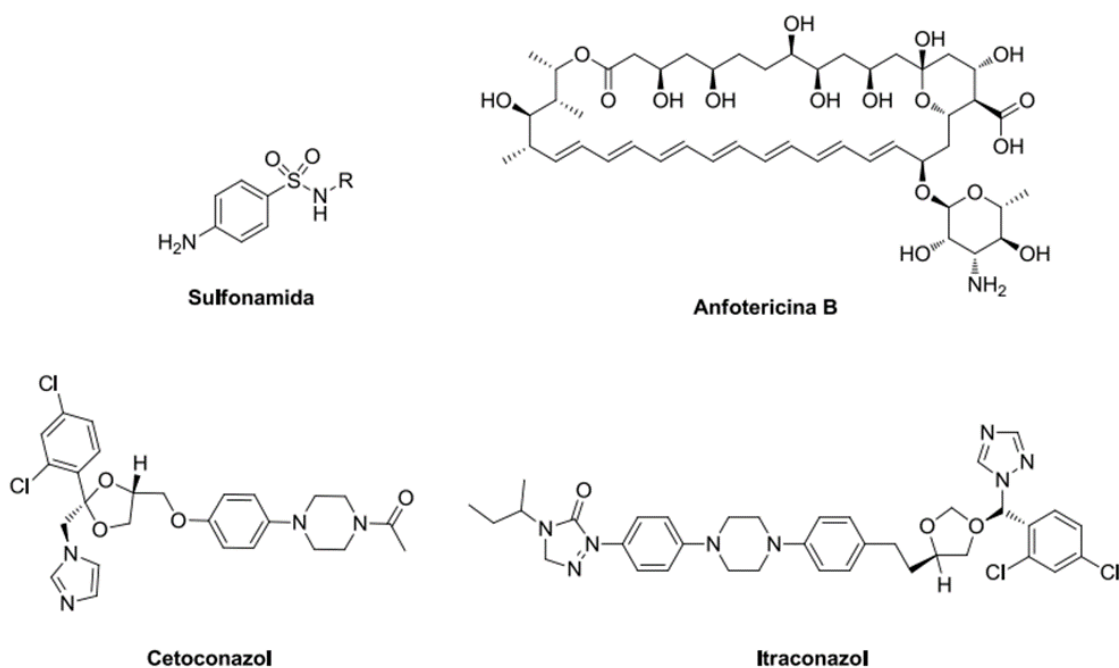


Figura 2. Estrutura química de antifúngicos tradicionais. São apresentadas as moléculas de sulfonamida e anfotericina B e, para os azóis, as moléculas de cetoconazol e itraconazol. Todos têm sido utilizados no tratamento da PCM, sendo que a maior variabilidade de fármacos disponíveis é da classe dos azóis (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Da classe de sulfonamidas utilizadas para a terapia química de PCM, formada por esse fármaco e seus derivados, o mais utilizado é a sulfodiazina, prevenindo a utilização, pelo fungo, do ácido p-aminobenzóico (PABA) na síntese do ácido fólico (necessário para a síntese de precursores de DNA e RNA). Este tratamento possui vantagem de ter baixo custo, ser rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e altamente distribuído pelo corpo, porém, os efeitos adversos (sintomas gastrontestinais, anemia hemolítica, reação de hipersensibilidade e outros) e a posologia (2 ou 3 doses de 500 mg a cada 6 horas, ou 100 mg.kg⁻¹ por dia, com máximo de 6g) são desvantagens importantes (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

Apesar da efetividade desses tratamentos, a alta taxa de mortalidade decorrentes de infecções fúngicas e a crescente incidência de micoses podem ser decorrentes do surgimento de resistência aos antifúngicos tradicionais, o que explicita a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos para este fim, além da busca por uma nova opção de um fármaco mais específico e eficiente, através de desenhos de fármacos com base na estrutura bioquímica dos alvos (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014b).

2.2- Fungos do gênero *Paracoccidioides*

O agente etiológico da Paracoccidioidomicose são fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*. Esse gênero pertence ao filo Ascomycota, da ordem Onygenales e família Onygenaceae e é composto por cinco espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* sensu stricto, conhecida como S1, sendo a mais amplamente distribuída, ocorrendo no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Peru e Venezuela; *Paracoccidioides americana* sp. nov., conhecida como PS2, identificada na Venezuela e no Brasil; *Paracoccidioides restrepiensis* sp. nov., conhecida como PS3, que era restrita à Colômbia, mas também foi encontrada na Venezuela; *Paracoccidioides venezuelensis* sp. nov., anteriormente conhecida como PS4, sendo restrita apenas a Venezuela e *Paracoccidioides lutzii*, encontrada no Brasil (TURISSINI et al., 2017).

Uma característica em comum de todos os patógenos dimórficos é o crescimento associado a alterações da temperatura, interferindo em seu estado morfológico (TAVARES et al., 2015a). O ciclo biológico dos fungos do gênero *Paracoccidioides* se inicia no solo, onde crescem como micélio saprófito à temperatura ambiente (**Figura 3.a**), produzindo conídios infecciosos. Quando os propágulos entram em contato com o epitélio alveolar, por conta do estresse físico (temperatura corporal do hospedeiro a 37°C), sofrem uma mudança morfológica, se transformando em levedura parasitária (**Figura 3.b**) (OLIVEIRA et al., 2015; SAN-BLAS, 1977).

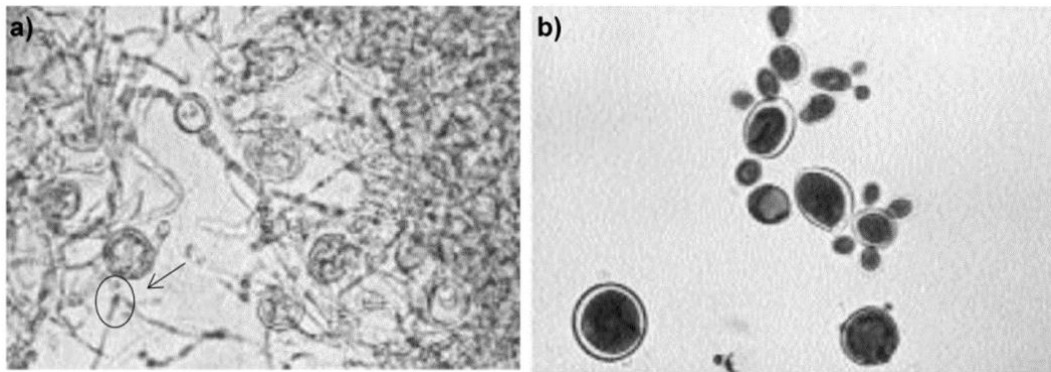


Figura 3. O fungo dimórfico *Paracoccidioides spp.* a) Fase de micélio, encontrada em temperaturas próximas a 25 °C. As regiões como a de destaque (círculo indicado pela seta) são os conídios atuantes no processo de infecção. b) Fase de levedura, com formato típico de roda de leme, encontrado em temperaturas próximas a 37 °C. Esta é a forma patogênica do fungo. Adaptado de Corredor et al. (1999).

O contágio do hospedeiro se procede por meio da inalação de conídios produzidos pela fase micelial do fungo. Ao serem aspirados, alcançam os brônquios e alvéolos pulmonares, instalando-se assim, no epitélio alveolar pulmonar e se manifestando, primeiramente, como uma infecção granulomatosa, podendo se espalhar para outros órgãos através da via hematogênica e linfática (DE OLIVEIRA et al., 2015; RITA; FORTES; MIOT, 2011).

A mudança morfológica do fungo por conta da alteração de temperatura, é uma etapa essencial para a patogênese do seu ciclo biológico, representado pela **Figura 4.**

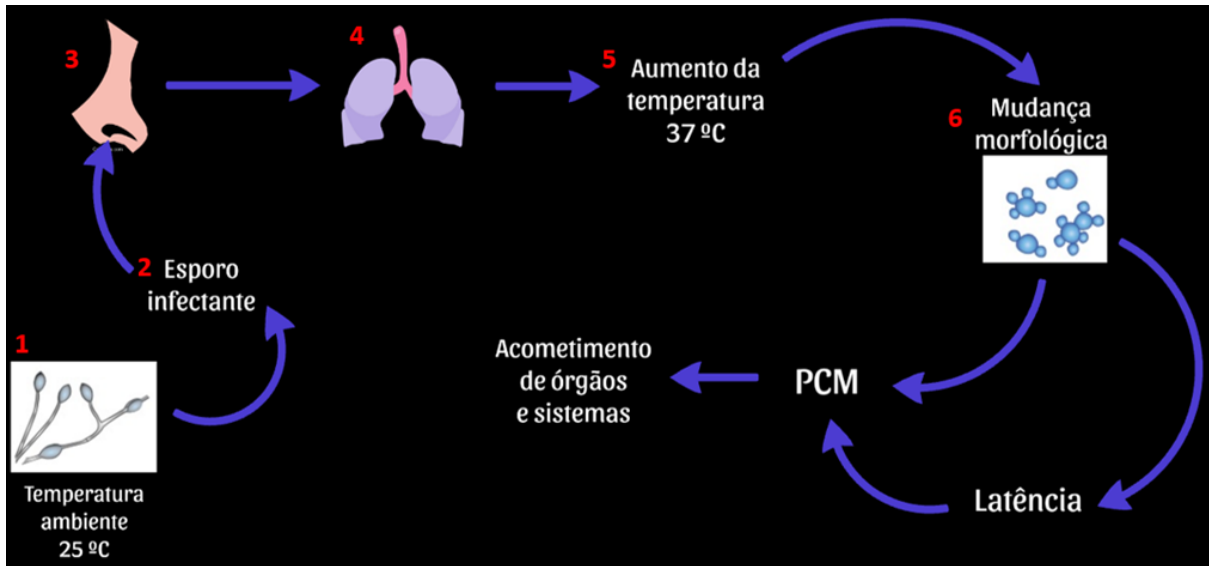


Figura 4. Ciclo de vida do fungo do gênero *Paracoccidioides*. 1- Fungo com crescimento na forma de micélio com hifas septadas no solo em temperatura ambiente. 2- Produção de esporos infectantes. 3- Aspiração dos aerossóis: esporos infectantes ou fragmentos do micélio do fungo. 4- Esporos são direcionados aos alvéolos pulmonares. 5- Temperatura corporal do hospedeiro, aproximadamente 37 °C, leva o fungo a uma mudança morfológica. 6- Com o aumento da temperatura em relação a temperatura do solo, o fungo sofre uma mudança morfológica, tornando-se levedura parasitária. Após a mudança morfológica o hospedeiro pode desenvolver a doença, acometendo órgãos e sistemas, ou o fungo pode entrar em estado de latência, e em casos de queda de imunidade ou estresse imunológico a doença pode se desenvolver. Imagem adaptada de Bagagli et al. (2008).

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* podem se reproduzir por meio de reprodução assexuada, dentro do organismo do hospedeiro até que o mesmo morra. Após a morte do hospedeiro, o fungo volta para o solo. Se o ambiente for favorável para sobrevivência e crescimento do fungo, esse sofrerá a mudança para a fase de micélio, reiniciando o ciclo e conseqüentemente sofrendo reprodução sexuada no ambiente (BAGAGLI et al., 2008).

A mudança morfológica leva a uma alteração na composição dos carboidratos da parede celular dos fungos, além de alteração moleculares (SAN-BLAS, G., NINO-VEGA, 2001). Enquanto a fase micelial apresenta β -1,3-glucana como principal polímero de glicose na sua parede celular, a fase leveduriforme reduz ao máximo esse carboidrato, substituindo-o por α -1,3-glucana. Enquanto a β -1,3-glucana é um antígeno reconhecível pelo sistema imune, a α -1,3-glucana não é, o que consiste em uma vantagem para o fungo (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017). Vários genes são diferencialmente expressos nessa transição micélio-levedura, como, por exemplo, genes para proteínas envolvidas na adaptação ao ambiente intracelular, onde há

baixa disponibilidade de glicose e aminoácidos, alta concentração de espécies reativas de oxigênio (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017).

2.3- Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF)

Pesquisadores utilizam estruturas de proteínas e seus ligantes para melhor entender a ação dos fármacos já existentes e desenvolver novos e mais poderosos medicamentos superando, por exemplo, a resistência criada pelos microrganismos alvo. Desse modo, conhecimentos bioquímicos-estruturais de proteínas dos fungos do gênero *Paracoccidioides* contribuiriam para uma melhor caracterização da biologia dessas espécies e sua interação com o hospedeiro, assim como no desenvolvimento de imunógenos para o diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de vacinas.

À vista disso, foi escolhida uma proteína ainda não caracterizada do fungo, chamada Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF), para a realização desse trabalho. A proteína MIF foi uma das primeiras citocinas a ser descoberta e, em humanos, inicialmente foi designada como um produto derivado de linfócitos T, que na presença de antígeno exibia a capacidade de prevenir o movimento de monócitos *in vitro* (BLOOM; BENNETT, 1966; DAVID, 1966), sendo conhecida como regulador chave da imunidade inata e adquirida, importante na indução da resposta inflamatória em humanos (BERNHAGEN et al., 1995; CALANDRA et al., 1995). MIF consegue modular a apoptose mediada por proteína supressora de tumor, possui uma interessante convergência com a resposta inflamatória de longa duração, e assim sendo, com a formação de tumores (HUDSON et al., 1999).

A MIF de mamíferos é normalmente encontrada como um homotrímero, cada subunidade possuindo duas atividades catalíticas diferentes (**Figura 5**): uma atividade de tautomerase, que requer um resíduo de prolina N-terminal e uma atividade tiol-proteína oxidoredutase, baseada em um motivo tiorredoxina-*like* (FLASTER et al., 2007; KLEEMANN et al., 1998).

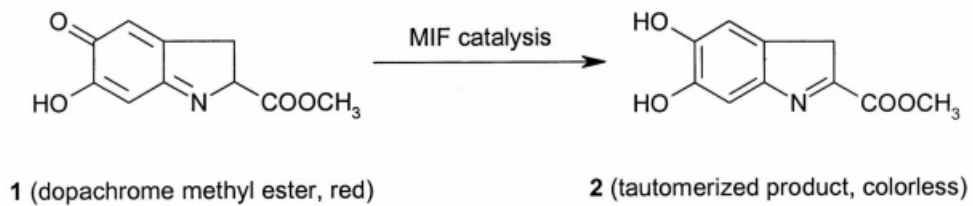


Figura 5. Reação de tautomerização. Estrutura do éster metílico dopacromo, um substrato cromogênico para a medição da atividade enzimática do MIF, e seu produto incolor tautomerizado. Nessa reação, uma dupla ligação carbono-oxigênio é deslocada para o átomo de carbono vizinho, consistindo, portanto, de uma tautomeria cetoenólica (SENER et al., 2002).

Sun e colaboradores (SUN et al., 1996a) elucidaram, pela primeira vez, a estrutura da MIF humana recombinante. Cada monômero dessa proteína contém duas α -hélices antiparalelas que são compactadas contra uma folha- β de quatro filamentos (**Figura 6A**). O monômero possui uma fita- β adicional que interage com as folhas- β de subunidades adjacentes para formar a interface entre os monômeros. As três folhas- β do trímero (**Figura 6B**) são dispostas para formar um barril contendo um canal acessível a solvente que atravessa o centro da proteína ao longo de um eixo molecular de simetria trigonal (**Figura 6C**). Mapas de potencial eletrostático revelaram que o canal tem um potencial positivo, sugerindo que ele liga moléculas carregadas negativamente.

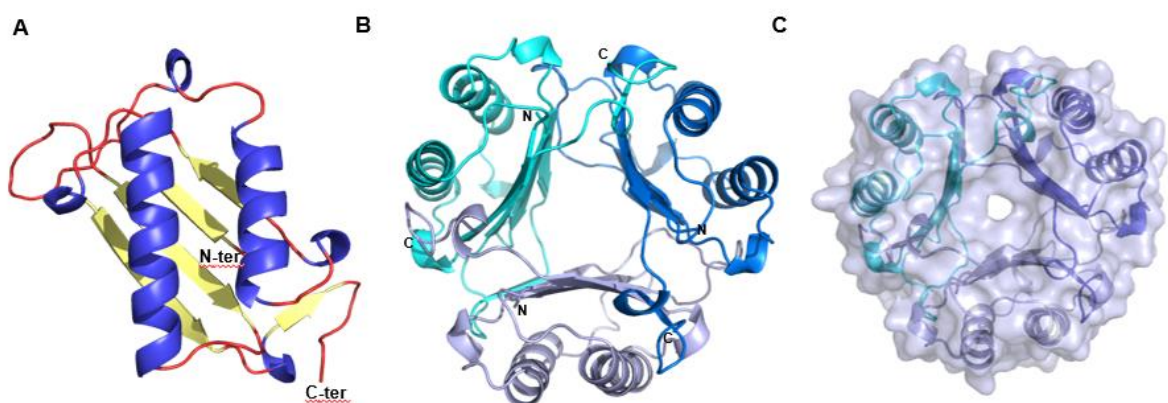


Figura 6. Estrutura tridimensional da MIF humana. A – Estrutura monomérica mostrando a duas α -hélices, a folha- β e a fita- β adicional. B – Arranjo dos monômeros formando o trímero funcional (cada monômero está colorido com uma tonalidade de azul). C - Superfície do trímero mostrando o canal acessível ao solvente (Figuras produzidas pelo autor baseadas na estrutura PDB: 1MIF - <https://www.rcsb.org/>).

Em mamíferos a proteína MIF é um importante mediador das condições inflamatórias, sendo descrita por ser uma citocina potente (FLASTER et al., 2007). A sequência de aminoácidos desta proteína apresenta alta homologia, aproximadamente 90%, em todos os mamíferos. Dessa forma, a conservação através das espécies sugere importantes funções biológicas do MIF. Além disso, o Fator Inibidor da Migração de Macrófagos estimula a produção de metaloproteinases da matriz, ciclooxigenase 2 e prostaglandina E2, ressaltando a importância do MIF na imunidade inata (LENG; BUCALA, 2006; MITCHELL et al., 2002).

A distribuição de MIF no organismo é muito vasta, sendo expressa em tecidos e órgãos que possuem contato direto com o ambiente, ou seja, pulmão, pele e trato gastrointestinal. Outra característica peculiar é a expressão em tecidos do sistema endócrino, em órgãos diretamente envolvidos com a resposta de estresse, tais como glândulas pituitária, adrenal e hipotálamo (BERNHAGEN et al., 1993; FINGERLE-ROWSON et al., 2003). Em indivíduos saudáveis, a MIF circula em concentrações séricas relativamente altas (2 - 6 ng/mL) (PETROVSKY et al., 2003). Contudo, dados na literatura indicam que a presença de níveis aumentados dessa citocina pode representar diferentes patologias inflamatórias (MIZUE et al., 2005; POWELL et al., 2005).

Homólogos de MIF têm sido identificados em diferentes genomas de bactérias, protozoários, nematódeos e vegetais (MISKA et al., 2007). Entre as proteínas homólogas de MIF estão as enzimas DDT (D-dopacromo tautomerase), CHMI (5-carboximetil-2-hidroximuconato isomerase) e 4-OT (oxalocrotonato isomerase, encontrada apenas em bactérias) que compartilham atividades similares às encontradas em mamíferos (MISKA et al., 2007).

Em helmintos, a secreção de MIF no local da infecção pode provocar a produção de MIF hospedeira endógena, criando um ambiente local provavelmente anti-inflamatório que facilita o crescimento e a sobrevivência do parasita. Além de funcionar retardando o reconhecimento imune pelos linfócitos durante a migração do tecido do parasita, permitindo o estabelecimento de uma infecção bem-sucedida, conseqüentemente, aumentando a sobrevivência do próprio parasita ao ataque imune do hospedeiro (CALANDRA et al., 1995; SHAO et al., 2008; VERMEIRE et al., 2008).

Augustijn e colaboradores (AUGUSTIJN et al., 2007) encontraram que a proteína MIF é expressa em todas as formas parasitárias de *Plasmodium berghei* examinadas ao longo do ciclo de vida desse parasita, sendo distribuída no citoplasma tanto do parasita quanto do eritrócito infectado. No entanto, apesar de a MIF não se mostrar essencial para nenhuma fase da vida do *Plasmodium*, foi observado que essa proteína parece agir em conjunto com a MIF do hospedeiro humano para suprimir a eritropoiese no contexto de uma infecção pelo parasita. Essa supressão pode levar à manutenção de um menor nível de parasitemia, o que pode contribuir a uma infecção mais duradoura.

Similar a outros homólogos, a MIF do parasita *Wuchereria bancrofti*, causador da filariose linfática, exibe atividade de tautomerase sobre substratos específicos, no entanto, o substrato funcional no parasita e/ou no hospedeiro é desconhecido (CHAUHAN, 2015). Nesse trabalho, Chauhan e colaboradores (2015) identificaram três moléculas: (S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid (ISO-1), 4-iodo-6-phenylpyrimidine (4-IPP) e curcumina que inibiram significativamente a atividade tautomerase da MIF. Como essa atividade não está envolvida na regulação imune da MIF humana, mas, possivelmente, está envolvida na patogênese do parasita, tais inibidores poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de fármacos para a prevenção da filariose.

3- OBJETIVOS

3.1- Geral

Caracterizar estrutural e bioquimicamente a proteína recombinante Fator Inibidor da migração de Macrófagos (MIF) que pode estar envolvida na virulência de fungos do gênero *Paracoccidioides*.

3.2- Específicos

- Obter a proteína recombinante MIF na sua fração solúvel e purificada em quantidades suficientes para os procedimentos posteriores;
- Caracterizar bioquimicamente a proteína recombinante MIF no que diz respeito à sua estrutura secundária, estado de agregação, interação com ligantes;
- Caracterizar cineticamente a proteína MIF;
- Realizar ensaios de imunoabsorção enzimática.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Análises *in silico* e clonagem da sequência codificadora de MIF de *Paracoccidioides*

A sequência codificadora da proteína Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) (código de acesso -NCBI: XP_010759550.1 para nucleotídeos e PADG_03671 para aminoácidos) foi analisada *in silico* utilizando os servidores XtalPred (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>) (SLABINSKI et al., 2007) e ExPasy (<http://web.expasy.org>) e os bancos de dados BLASTPx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) e Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Após análise, a empresa GenScript (Piscataway, EUA) sintetizou quimicamente a sequência nucleotídica de acordo com a sequência enviada, clonou no vetor pUC57 e, posteriormente, subclonou no vetor pET28a(TEV) utilizando as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* em ambas as clonagens.

A proteína MIF possui uma sequência de 166 aminoácidos (**Quadro 1**) e massa molecular de 18,5 kDa.

Quadro 1. Sequência de aminoácidos da proteína MIF. Sequência dos 166 aminoácidos da MIF. A sequência está escrita em código de uma letra e da extremidade N-terminal para a C-terminal.

1	10	20	30	40	50	60	70
MPSIELLTNV	ALSREQSKEL	ALSLSKASAR	ILKKPESFIS	VQIRSDEILT	FAGTHDCMY	LIYTSAFMYH	
	80	90	100	110	120	130	140
MRRTNNMAPL	GFQMRITSLG	NLNPADNVNF	SKAFTDFLKE	EIGVTNDRGY	VIFYDPGKLA	AGPLTECEIF	
	150	160					
SEQILTSFAD	YANLGYGTT	GAKLWC					

Para expressão da proteína MIF, plasmídeos pET28a(TEV) (**Figura 7**) contendo o gene codificante da MIF foram inseridos em bactérias eletrocompetentes

Para predição de estruturas secundárias foram utilizados os servidores ESPrpt (<http://esprpt.ibcp.fr/>) e PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) que predizem estrutura secundária a partir da estrutura tridimensional e a partir da sequência primária, respectivamente.

Posteriormente, a sequência também foi analisada no servidor I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para predição de estrutura terciária a partir de uma abordagem hierárquica que combina predição baseada em sequência com similaridade estrutural dos modelos inicialmente gerados, de forma a otimizar o modelo final.

A produção das imagens a partir dos modelos gerados e alinhamentos estruturais foram realizados no programa Pymol (pymol.org).

4.2- Expressão heteróloga

4.2.1- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Bactérias *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene MIF clonado foram inoculadas em 20 mL de meio LB suplementado com antibiótico canamicina (concentração final 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Após incubação por 18 horas a 37 °C e 250 rpm, essa cultura foi transferida para 500 mL de meio LB/canamicina e, após alcançar OD600 entre 0,5-0,6, foi adicionado isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,5 mmol.L^{-1} para indução da expressão por mais 4 horas a 37 °C e 250 rpm.

Em comparação ao protocolo original, em testes posteriores, o tempo (4, 18 e 24 horas), a temperatura (18 a 37 °C) da indução da expressão, além da concentração de IPTG (0,5 e 1 mM) foram variados.

4.2.2- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* Arctic Express(DE3)

Bactérias *E. coli* Arctic Express(DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene MIF clonado foram inoculadas em 20 mL de meio LB

suplementado com antibiótico canamicina (concentração final 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e gentamicina (concentração final 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Após incubação por 18 horas a 37 °C e 250 rpm, essa cultura foi transferida para 500 mL de meio LB (sem antibiótico). Após incubação por 3 horas a 30 °C e 250 rpm e depois de mais 10 minutos a 12 °C e 250 rpm, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,5 mmol.L^{-1} para a indução da expressão por mais 24 horas a 12 °C e 250 rpm.

Alternativamente, o tempo e a temperatura de indução da expressão, assim como a concentração de IPTG foram variados.

4.2.3- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* Rosetta(DE3)

Bactérias *E. coli* Rosetta(DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene MIF clonado foram inoculadas em 10 mL de meio LB suplementado com antibiótico canamicina (concentração final 50 $\mu\text{g.mL}$) e cloranfenicol (concentração final 34 $\mu\text{g.mL}$). Após incubação por 18 horas a 37 °C e 200 rpm, essa cultura foi transferida para 1 L de meio LB/canamicina e cloranfenicol que foi incubada a 37 °C e 200 rpm até que atingisse a OD600 ideal (entre 0,5 e 0,6). Depois desse período, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,5 mmol.L^{-1} para indução da expressão por mais 4 horas a 37 °C e 200 rpm.

Alternativamente, o tempo e a temperatura de indução da expressão, assim como a concentração de IPTG foram variados.

4.2.4- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* C43(DE3) pLysS

Bactérias *E. coli* C43(DE3)pLysS transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene MIF clonado foram inoculadas em 10 mL de meio LB suplementado com antibiótico canamicina (concentração final 50 $\mu\text{g.mL}$) e cloranfenicol (concentração final 34 $\mu\text{g.mL}$). Após incubação por 18 horas a 37 °C e 250 rpm, essa cultura foi transferida para 500 mL de meio LB/canamicina e cloranfenicol que foi incubada a 37 °C e 250 rpm até que atingisse a OD600 ideal

(entre 0,8 e 1,0). Depois desse período, foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mmol.L^{-1} para indução da expressão por mais 4 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250 rpm.

Alternativamente, o tempo (4 e 18 horas) e a temperatura (30 a $37 \text{ }^\circ\text{C}$) da indução da expressão foram variados.

4.2.5- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* Lemo(DE3)

Bactérias *E. coli* Lemo(DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene MIF clonado foram inoculadas em 10 mL de meio LB suplementado com antibiótico canamicina (concentração final $30 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) e cloranfenicol (concentração final $30 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubado por 18 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250 rpm. Um mililitro dos 10 mL do pré-inóculo foi transferido para 10 mL de meio LB, suplementado com canamicina e cloranfenicol contendo diferentes concentrações de rhamnose (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,7; 1 e 2 mmol.L^{-1}). Esse inóculo foi então incubado a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250 rpm até que atingisse a OD600 entre 0,4 e 0,8. Depois desse período, foi adicionado IPTG na concentração final de $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ para indução da expressão por mais 4 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250 rpm.

Alternativamente, o tempo (4 e 18 horas) e a temperatura (20 a $30 \text{ }^\circ\text{C}$) da indução da expressão foram variados.

4.2.6- Expressão com adição de etanol

Para expressão com adição de etanol, foi realizado em pré-inóculo padrão, com cepas de *E. coli* Rosetta, contendo 20 μL de clone, 5 mL de meio LB suplementado com canamicina e cloranfenicol. Esse pré-inóculo foi incubado por 18 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250 rpm.

No teste inicial de expressão, 20 μL do pré inoculo foram adicionados a 5 mL de meio LB e, a cada inóculo teste, foi adicionado etanol para as concentrações finais de 1, 2, e 3 %, sendo que um inóculo não recebeu etanol para funcionar como controle. Esses inóculos foram incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250rpm até atingirem OD600 ideal (entre

0,5 a 0,8). Subsequente ao tempo de crescimento, as amostras foram induzidas com IPTG a concentração final de 0,5 mM e incubadas por mais 4 horas a 37 °C e 250rpm.

Após este primeiro teste, foi realizado um segundo com um volume maior de meio LB, ou seja, 2 mL do pré inóculo foram adicionados a 500 mL de meio LB com etanol a uma concentração final de 1%, e incubado a 37 °C por 4 horas a 250 rpm até atingir a OD600 ideal. A indução foi feita também com IPTG a concentração final de 0,5mM, incubada por 4 horas a 37 °C e 250rpm.

4.3- Lise Bacteriana

Após o tempo final de indução, as células bacterianas foram coletadas por meio de centrifugação a 5000 g por 15 minutos. Os precipitados foram resuspendidos em uma proporção de 5 µL de tampão de lise (100 mmol.L⁻¹ de Tris-base pH 8,5; 500 mmol.L⁻¹ de NaCl; 25 mmol.L⁻¹ de sacarose; 10 mmol.L⁻¹ de MgCl₂; 10% (v.v⁻¹) de glicerol; 1% (v.v) de Tween 20; 5 mmol.L⁻¹ de sacarose; 10 mmol.L⁻¹ de β-mercaptoetanol; 2 mmol.L⁻¹ de PMSF) por cada 1 mg de precipitado.

Após a ressuspensão com o tampão de lise, as amostras foram transferidas para tubos de 50 mL e submetidas a 3 ciclos de congelamento (-80 °C) e descongelamento (temperatura ambiente) e, em seguida, submetidas a 5 ciclos de sonicação de 1 minuto em banho de gelo com intervalos de 30 segundos. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 4 °C durante 30 minutos a 12.000 x g. Alternativamente, alterações no processo de lise celular foram realizadas.

O acompanhamento da expressão e a visualização da proteína MIF no extrato solúvel ou insolúvel pós a lise foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

4.4- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), como descrita por Laemmli (1970), no sistema Mini-Protean Tetra Cell da BioRad (Hercules, USA). As proteínas foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos em tampão de amostra (0,2 % (p.v⁻¹) de SDS; 50 % (v.v⁻¹) de glicerol; 0,01 % (p.v⁻¹) de azul de bromofenol e 2 % (v.v⁻¹) de β-mercaptoetanol em 0,31 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 6,8) e separadas em gel contendo 15 % (p.v⁻¹) de poliacrilamida, 0,3 % (p.v⁻¹) de bis-acrilamida e 0,1 % (p.v⁻¹) de SDS em 0,375 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 8,8. O gel de empilhamento foi constituído de 3 % (p.v) de poliacrilamida, 0,3 % (p.v⁻¹) de bis-acrilamida e 0,1 % (p.v⁻¹) de SDS em 0,125 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 6,8. Os géis de empilhamento e separação foram polimerizados na presença de 0,1 % (p.v⁻¹) de persulfato de amônio e (1:2000, v.v⁻¹) de TEMED. A corrida foi realizada em tampão constituído de 0,192 mmol.L⁻¹ de glicina, 0,1 % (p.v⁻¹) de SDS e 0,025 mmol.L de Tris-base pH 8,5 em uma voltagem constante de 120 V.

Para visualizar as bandas de proteínas, o gel foi incubado por pelo menos três horas em solução de 15 % (v.v⁻¹) de metanol, 7 % (v.v⁻¹) de ácido acético e 0,25 % (p.v⁻¹) “Coomassie Brilliant Blue” R250. A seguir a solução de 50 % (v.v⁻¹) de metanol e 10 % (v.v) de ácido acético foi utilizada para a remoção do excesso de corante. Os géis foram então fotografados.

Como alternativa, foi utilizada também, para visualizar as bandas com menor concentração de proteína, a coloração com nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987). Para isso, o gel foi incubado *overnight* numa solução de fixação (metanol 50% (v.v⁻¹), ácido acético 12 % (v.v⁻¹)). Em seguida, foram realizadas três lavagens de 10 minutos, sob agitação, com etanol 50 % (v.v⁻¹). Após essa etapa, o gel foi incubado por 1 minuto na solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p.v⁻¹), seguida de três lavagens de 20 segundos com H₂O. Posteriormente, o gel foi incubado numa solução de nitrato de prata 0,2 % (p.v⁻¹) com formaldeído 13,7 % (v.v⁻¹). Por fim, após três lavagens com H₂O de 20 segundos, foi adicionada a solução reveladora (carbonato de cálcio 4 % (p.v⁻¹); tiosulfato de sódio 0,04 % (v.v⁻¹) e formaldeído 6,85 % (v.v⁻¹)). Após o aparecimento das bandas, a revelação foi interrompida com ácido acético glacial.

Foram utilizados três tipos de marcadores moleculares: o marcador de peso molecular “*Precision Plus Protein Unstained Standard*” (BioRad) que contém 10 proteínas recombinantes (variando de 10 a 250 kDa), incluindo 3 bandas de referência (25, 50 e 75 kDa); um marcador (marcador LBBMP), montado no nosso próprio laboratório que contém quatro proteínas com massas moleculares de 67 (Albumina), 43 (Ovoalbumina), 25 (Quimiotripsinogênio) e 13,7 (Ribonuclease A) kDa e o marcador “Pierce™ Unstained Protein MW Marker” que contém 7 proteínas (variando de 116 a 14,4 kDa).

Para organização dos resultados de purificação representados pelas imagens de géis de SDS-PAGE o seguinte padrão de apresentação e organização do gel foi seguido: **AP** – aplicação da amostra na coluna cromatográfica, **LV** – lavagem da coluna cromatográfica antes e depois da aplicação da amostra, **E** – eluição da amostra, **H2O** – última lavagem da coluna cromatográfica com água destilada.

4.5- Purificação da proteína recombinante por cromatografia por afinidade a partir do extrato insolúvel

Para purificar a proteína de interesse, a fração insolúvel solubilizada em ureia 8 mol.L⁻¹ e 6 mol.L⁻¹, foi submetida à cromatografia por afinidade para posterior renaturação.

A cromatografia por afinidade foi realizada utilizando duas resinas, uma de Ni²⁺ (HiTrap HP - GE Healthcare Biosciences) e outra de Co²⁺ (TALON – Sigma Aldrich).

Para a purificação por afinidade ao níquel, 7 mL da resina foi pré-equilibrada com 5 volumes de tampão de equilíbrio (100 mmol.L⁻¹ de Tris pH 8,0; 500 mmol.L de NaCl; 30 mmol.L⁻¹ de imidazol; 8 mol.L⁻¹ de ureia).

A fase insolúvel, obtida após lise celular e solubilizada em 8 mol.L⁻¹ de ureia, foi adicionada de 30 mmol.L⁻¹ de imidazol (concentração final) e aplicada na coluna. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio e a proteína recombinante foi eluída pela passagem de 5 mL do tampão de eluição com gradiente de imidazol (100 mmol.L⁻¹ de Tris pH 8,0; 500 mmol.L⁻¹ de NaCl;

diferentes concentrações de imidazol 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mmol.L⁻¹ e ureia 8 mol.L⁻¹).

A cromatografia por afinidade também foi realizada em “*batch*” com as resinas de Ni²⁺ e Co²⁺ que foram pré-equilibradas em um tubo Falcon com 3 volumes de tampão de equilíbrio (100 mmol.L⁻¹ de Tris pH 8,0; 500 mmol.L de NaCl; 30 mmol.L⁻¹ de imidazol; 6 mol.L⁻¹ de ureia), sendo lavadas por inversão 3 vezes, centrifugando a 5000g por 5 minutos e descartando o sobrenadante. As frações insolúveis, obtidas após lise celular e remoção dos debris, já solubilizado em 6 mol.L⁻¹ de ureia, foi adicionado 30 mmol.L⁻¹ de imidazol (concentração final) e esses materiais foram então adicionados nas resinas equilibradas e deixados sob agitação leve por 45 minutos a 4 °C. Passado o tempo de agitação a resina foi centrifugada a 5000 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado refrigerado para análise em SDS-PAGE. A proteína recombinante foi eluída pela lavagem de 5 mL do tampão de eluição, por inversão, com gradiente de ureia (100 mmol.L⁻¹ de Tris pH 8,0; 500 mmol.L⁻¹ de NaCl; diferentes concentrações de ureia 4, 2, 1, 0,5 e 0 mmol.L⁻¹ e imidazol 500 mmol.L⁻¹).

As frações obtidas após cada etapa da purificação foram analisadas por SDS-PAGE 15 %.

4.6- Purificação da proteína recombinante por cromatografia por afinidade a partir do extrato solúvel

A fração solúvel obtida após lise celular foi também submetida à purificação por afinidade ao níquel ou cobalto seguindo os mesmos protocolos apresentados no item 4.5, com exceção de que não houve a adição de ureia nem na amostra nem nos tampões.

Alternativamente, a purificação por afinidade ao cobalto foi realizada utilizando o seguinte protocolo: a resina foi pré-equilibrada com 20 mL do tampão de ligação (50 mM fosfato de sódio, 300 mM NaCl, pH 7,4). A amostra (sem adição de imidazol) foi então adicionada à resina sob agitação leve por 60 minutos a 4°C. Após esse tempo, a mistura foi adicionada a uma coluna vazia e, após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 20 mL do tampão de lavagem (50 mM fosfato de sódio, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7,4). Por fim, as proteínas ligadas à coluna foram eluídas pela

passagem de 20 mL do tampão de eluição (50 mM fosfato de sódio, 300 mM NaCl, 150 mM imidazol, pH 7,4).

As frações obtidas após cada etapa da purificação foram analisadas por SDS-PAGE 15 %.

4.7- Diálise e concentração da proteína recombinante

Após a cromatografia por afinidade, a amostra contendo as frações obtidas após a eluição foram submetidas a diálise. Para isso, 20 mL de amostra foram adicionados a um saco de diálise utilizando uma membrana de celulose de *Cut off* de 12 a 14 kDa e colocando em contato com 2 L de tampão com concentrações decrescentes de imidazol (50 mmol.L de Tris-HCl pH 8,0; 100 mmol.L de NaCl e diferentes concentrações de imidazol 300, 150, 50 e 0 mmol.L⁻¹) para retirada do mesmo, e para amostras com ureia foi feito um tampão com gradiente de ureia (100 mmol.L de Tris-HCl pH 8,0; 500 mmol.L de NaCl e diferentes concentrações de ureia 4, 2, 1, 0,5 e 0 mol.L⁻¹) por 18 horas a 4 °C com leve agitação. Foram realizadas 5 trocas de tampão.

Depois de dialisada a amostra foi concentrada utilizando protocolo Vivaspin® Turbo 15 (Sartorius), *Cut off* 10 kDa, e centrifugação refrigerada por 30 minutos a 4 °C e 6500 *g*.

Também foram avaliadas diferentes formas de concentração da amostra dialisada: liofilização por 24 h seguida de ressuspensão no mesmo tampão da última etapa de diálise (50 mmol.L de Tris-HCl pH 8,0; 100 mmol.L de NaCl); concentração utilizando Vivaspin 3 kDa e, por fim, concentração com membrana de diálise coberta com pó de PEG 12000 (COITINHO et al., 2012).

4.8- Western Blot

O gel de SDS-PAGE após a corrida eletroforética foi colocado sobre uma membrana de PVDF, ambos embebidos em tampão 48 mmol.L⁻¹ de Tris pH 9,2; 39 mmol.L⁻¹ de glicina e 20 % metanol. O sistema foi colocado em uma cuba específica para transferência semi-dry sendo submetido a uma voltagem constante de 25 V

durante 40 minutos. O marcador de massa molecular utilizado foi o *Pierce™ “Prestained Protein MW Marker”* (ThermoFisher Scientific), com 6 proteínas abrangendo de 20 a 120 kDa.

Após a retirada do sistema, a membrana foi bloqueada por 30 minutos com leite desnatado 10 % em tampão TBS-T (20 mmol.L⁻¹ de Tris-base pH 7,6; 500 mmol.L⁻¹ de NaCl e 0,1 % Tween). Após três lavagens em tampão TBS-T, a membrana foi incubada *overnight* sob agitação a 4 °C com anticorpo primário específico anti-histidina (Sigma, St. Louis, USA) diluído 1:3000 em tampão TBS-T-leite desnatado 5 %. Depois de 5 lavagens com tampão TBS-T, o anticorpo secundário anti-imunoglobulina conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG – whole molecule -peroxidase conjugate, Sigma, St. Louis, USA) na diluição de 1:5000 em TBS-T-leite desnatado 5 % foi adicionado e incubado por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente.

A membrana foi revelada por quimiluminescência (técnica ECL – “*Enhanced Chemiluminescence*”) e a marcação visualizada no equipamento Chemidoc (BioRad).

Os ensaios de *Western blot* foram realizados no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC) da UFES, coordenado pelas professoras Dra. Cristina Martins e Silva e Dra Rita Gomes Wanderley Pires e no Laboratório de Biologia Estrutural (BIOEST) coordenado pelo Prof. Dr. Ronaldo Nagem, na Universidade Federal de Minas Gerais.

4.9- Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Para avaliar a reatividade dos soros humanos contra a proteína de interesse, placas de microtitulação de fundo chato foram sensibilizadas *overnight* com 100 µL de uma solução de 10 µg/mL da proteína em 0,5 mol.L⁻¹ tampão carbonato, pH 9,6 a 4° C. As placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (0,05 mol.L⁻¹ PBS contendo 0,05% Tween 20 - PBS-T) e bloqueadas com 150 µL de solução de bloqueio (1,6% caseína em 0,15 mol.L⁻¹ PBS, pH 7,4), a 37° C. Depois de 1 h de incubação, as placas foram lavadas novamente e preenchidas com 100 µL de uma diluição de 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400 dos soros humanos, infectados ou não, em 0,25% caseína em 0,15 M PBS, pH 7,4, e incubados novamente por 1 h a 37° C.

As placas foram lavadas 10 vezes com PBS-T e incubados por mais uma hora com 100 μ L de uma diluição de 1/50.000 e de 1/40.000 de anticorpo de cabra anti-humano IgG conjugado a peroxidase (Sigma) em 0,25% caseína em 0,15 M PBS, pH 7,4. As placas foram então lavadas dez vezes com PBS-T e a atividade da peroxidase foi determinada com 100 μ L de solução de tetrametilbenzidina (TMB) pré-corado. A revelação foi parada nos dois casos com 50 μ L de H₂SO₄ 2N. A densidade ótica de 450 nm foi então registrada em um leitor de ELISA automático.

Os testes de ELISA foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, com a coordenação do Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes, e supervisionado pela Dra. Viviane Cristina Fernandes dos Santos.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Análises *in silico* da proteína MIF

No trabalho de Desjardins e colaboradores (DESJARDINS et al., 2011) foram identificados, nas espécies *P. brasiliensis* (antiga PS1 ou Pb18), *P. americana* (antiga PS2 ou Pb03) e *P. lutzii* (Pb01), vários alvos potenciais para fármacos e vacinas. Uma dessas proteínas foi o fator inibidor de migração de macrófago (MIF).

Com vistas a uma posterior determinação da estrutura tridimensional da proteína MIF de *Paracoccidioides* sp. por cristalografia de raios-X, a sequência de aminoácidos de MIF (acesso PADG_03671) foi analisada utilizando o servidor XtalPred. Esse servidor faz uma predição da facilidade de cristalização de proteína combinando, em uma única pontuação, características diferentes que influenciam a cristalização (tamanho, ponto isoelétrico, índice de hidropatia – *GRAVY index*, regiões desordenadas, índice de instabilidade, porcentagem de estruturas *coil*, *coiled coil* e índice de inserção em membrana).

O XtalPred ainda fornece a classificação das proteínas de acordo com dois métodos: o método EP, que é feito pela combinação individual das probabilidades de cristalização calculadas para as características proteicas mencionadas anteriormente e o método RF, que adiciona outras quatro características preditas - razão entre a área de superfície (soma das acessibilidades ao solvente dos resíduos individualmente) e a área total estimada da proteína, hidrofobicidade da superfície, entropia da cadeia lateral de resíduos da superfície e composição de aminoácidos da superfície predita da proteína. Assim, a combinação desses dois métodos pode fornecer uma previsão da facilidade com que a proteína analisada irá cristalizar.

A **figura 8** apresenta o resultado simplificado apresentado pelo servidor XtalPred para a MIF, mostrando as oito características avaliadas pelo método EP, além da presença de hélice transmembrana e peptídeo sinal (preditas pelos servidores TMHMM 2.0 - <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> e RPSB - <http://rpsb.bioinfo.pl/>, respectivamente, que são utilizados dentro do próprio XtalPred). Para a MIF, o índice EP foi 1 (numa escala de 1 a 5, sendo 1 o mais promissor) e o

índice RF foi 7 (numa escala de 1 a 10, onde 1 é o mais promissor). O índice combinado EP + RF foi 3.

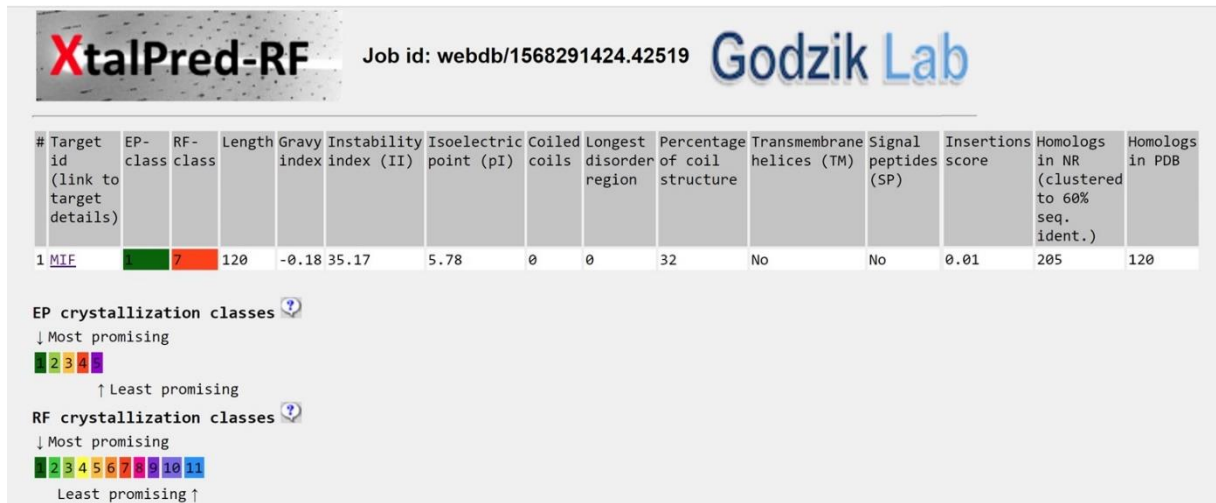


Figura 8. Resultado apresentado pelo servidor XtalPred para a proteína MIF. Nessa análise, as proteínas são classificadas de acordo com sua “facilidade de cristalização” por meio do método EP e RF. O índice combinado EP + RF foi 3.

A sequência primária de MIF também foi analisada no servidor “*Expasy ProtParam*” (<http://web.expasy.org/protparam/>), para determinar o tamanho da proteína a ser expressa, coeficiente de extinção molar e outras características relevantes (**Tabela 1**).

Tabela 1. Parâmetros da proteína MIF obtidos pelo servidor Expasy.

Parâmetros	MIF
Tamanho (kDa)*	18,5
Tamanho (kDa) com cauda de His	20,5
Número de aminoácidos	166
ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) a 280 nm**	15930
pI teórico	6,11

*Sem a cauda de histidinas e sítio TEV adicionada pelo vetor pET28a(TEV)

** Assumindo todos os resíduos de Cys reduzidos

Além da facilidade de cristalização predita pelo servidor XtalPred, também foram avaliadas, manualmente, as seguintes características da proteína MIF:

- 1- Similaridade de estrutura primária com outras proteínas (utilizando o banco de dados BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>));
- 2- Disponibilidade de ensaio funcional relativamente mais simples (ensaio enzimático, por exemplo);
- 3- Estrutura tridimensional já resolvida em fungos do gênero *Paracoccidioides* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>);

MIF foi analisada quanto à sua similaridade com outras proteínas, incluindo as espécies do gênero *Paracoccidioides*: *P. brasiliensis* (antiga PS1 ou Pb18), *P. americana* (antiga PS2 ou Pb03) e *P. lutzii* (Pb01). Para isso, a sequência codificadora de MIF foi pesquisada no servidor Blastx. Esse servidor busca por similaridades em banco de dados de proteínas a partir de uma sequência nucleotídica. Assim, foi possível observar que a proteína MIF desse trabalho apresenta alta similaridade entre as três espécies do fungo *Paracoccidioides* analisadas: 100% para *P. brasiliensis*, 99,17% para *P. americana* e 94,17 % para *P. lutzii* (**Figura 9**).

Sequences producing significant alignments		Download	Manage Columns	Show	100		
		Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein PADG_03671 [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	213	213	99%	4e-69	100.00%	XP_010759550.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein GX48_05376 [Paracoccidioides brasiliensis]	213	213	99%	2e-68	99.17%	ODH48509.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein PAAG_01158 [Paracoccidioides lutzii Pb01]	202	202	99%	4e-65	94.17%	XP_002797299.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein EMCG_06148 [Emmonsia crescens UAMH 3008]	175	175	98%	2e-54	79.83%	KKZ68187.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phenylpyruvate tautomerase [Emmonsia crescens]	172	172	98%	2e-53	78.15%	PGH33406.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein EMPG_12194 [Blastomyces silvaeae]	172	172	98%	3e-53	77.31%	KLJ12826.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein GX51_05084 [Blastomyces parvus]	170	170	98%	2e-52	77.31%	PGH01642.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Blastomyces gilchristii SLH14081]	170	170	98%	3e-52	75.63%	XP_002626195.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein ACJ73_00582 [Blastomyces percursorus]	154	154	98%	5e-46	65.55%	QJD28027.1
<input checked="" type="checkbox"/>	predicted protein [Histoplasma capsulatum G186AR]	149	149	98%	5e-44	69.75%	EEH05802.1
<input checked="" type="checkbox"/>	predicted protein [Histoplasma capsulatum NAM1]	146	146	98%	5e-43	68.91%	XP_001538298.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein AJ79_06895 [Helicocarpus griseus UAMH5409]	128	128	85%	5e-36	69.90%	PGH05009.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein SCHCODRAFT_232894 [Schizophyllum commune H4-8]	104	104	70%	4e-26	50.00%	XP_003036242.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Tautomerase/MIF [Pluteus cervinus]	100	100	98%	6e-25	46.22%	TFK72217.1

Figura 9. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína MIF utilizando o servidor BLASTx. A MIF deste trabalho apresenta grande similaridade entre as diferentes espécies do gênero *Paracoccidioides*.

Essa similaridade é importante porque as diferentes espécies de *Paracoccidioides* causadoras da PCM podem responder de forma diferente ao tratamento ou a um ensaio diagnóstico, caso a proteína MIF mostre, no futuro, promissora para testes de diagnóstico ou como alvo de medicamentos.

Por exemplo, anticorpos anti-Gp43, uma glicoproteína de 43 kDa (Gp43) reconhecida como o principal antígeno em testes de diagnóstico da PCM, não foram detectados no soro de um paciente com PCM disseminada (VIDAL et al., 2005). Também foi observado, por exemplo, que antígenos das espécies de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* levaram a diferentes respostas humorais em PCM crônica (LENHARD-VIDAL et al., 2013).

Lehnhard-Vidal e colaboradores (LENHARD-VIDAL et al., 2013) sugerem que mais pesquisas sejam realizadas utilizando soros de pacientes de diferentes regiões endêmicas para identificar se uma espécie pode ser utilizada com uma fonte principal de antígenos para o sorodiagnóstico da PCM ou, se uma mistura de antígenos de diferentes espécies seria mais adequado.

Assim, o ideal seria utilizar antígenos com baixa variabilidade genética nas espécies de *Paracoccidioides* que sejam expressos em todos os isolados. Esses aspectos, juntos com outras características, seriam determinantes para classificar uma proteína como de alto potencial para uso como ferramenta de diagnóstico (GARCIA BLANCO et al., 2011).

Além da similaridade, a pesquisa no BLASTx também identificou a MIF como pertencente à superfamília da oxalocrotonato tautomerase (**Figura 10**) condizente com a função enzimática desempenhada por MIF, o que garante que, uma vez obtida a proteína, ela poderá ser caracterizada tanto em relação às suas características cinéticas quanto em relação a possíveis inibidores.

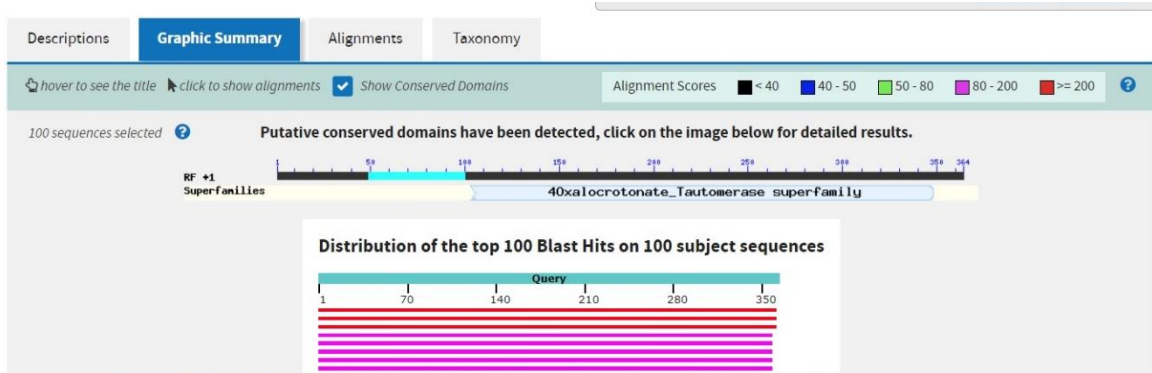


Figura 10. Alinhamento no Blastx mostrando a identificação de um domínio conservado. A proteína MIF foi classificada como pertencente à superfamília da oxalocrotonato tautomerase.

Além de comprovar a similaridade entre as diferentes espécies do fungo que foram analisadas, esse alinhamento também mostrou que a MIF de *Paracoccidioides* apresenta baixa similaridade (30 % de identidade) com a MIF humana (**Figura 11**).

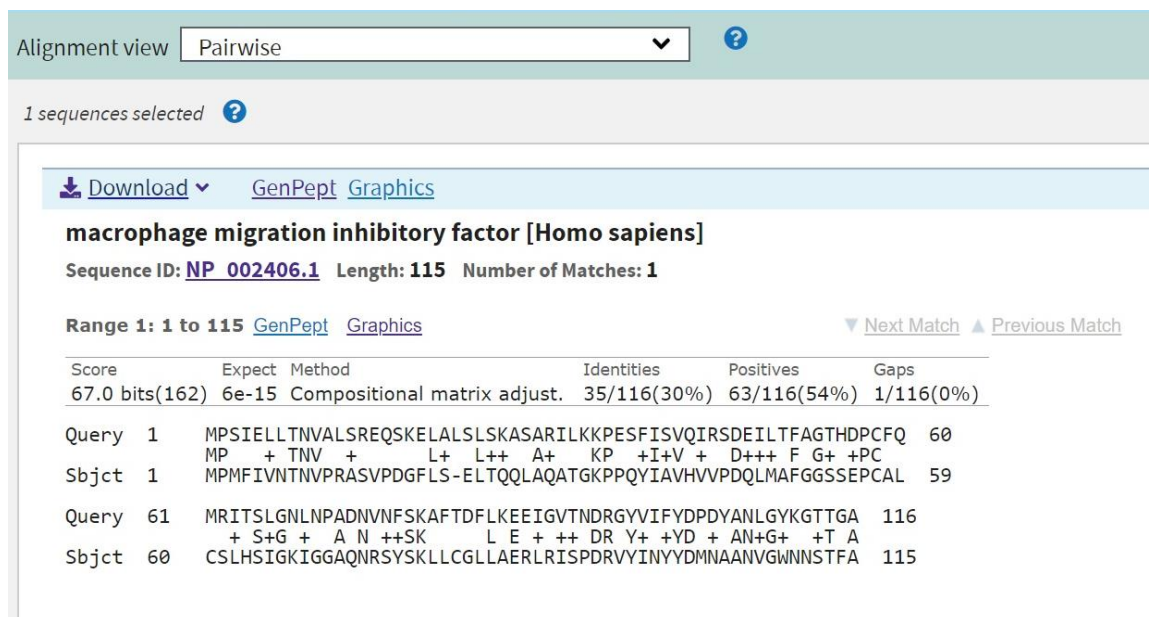


Figura 11. Alinhamento da sequência primária de MIF de *Paracoccidioides brasiliensis* e humana. As sequências apresentam 30 % de identidade.

A sequência de aminoácidos de MIF também foi submetida à pesquisa por similaridade com proteínas que apresentam estrutura tridimensional conhecida utilizando o *Protein Data Bank* - PDB (<https://www.rcsb.org/>) mostrando que não existe estrutura resolvida para a MIF de *Paracoccidioides* sp. e nem de outros fungos.

Também foram analisadas as similaridades de estrutura secundária entre a MIF humana e a MIF de *Paracoccidiodies* utilizando os servidores ESPrpt (<http://esprpt.ibcp.fr/>) e PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Nessa análise (**Figura 12**), o ESPrpt realizou o alinhamento entre a sequência primária das duas proteínas e a marcação de elementos de estrutura secundária a partir da estrutura tridimensional já resolvida da MIF humana disponível no PDB sob o código 1GCZ. Já o PSIPred realizou uma predição de estruturas secundárias da MIF de *Paracoccidiodies* a partir da estrutura primária (já que sua estrutura tridimensional é desconhecida).

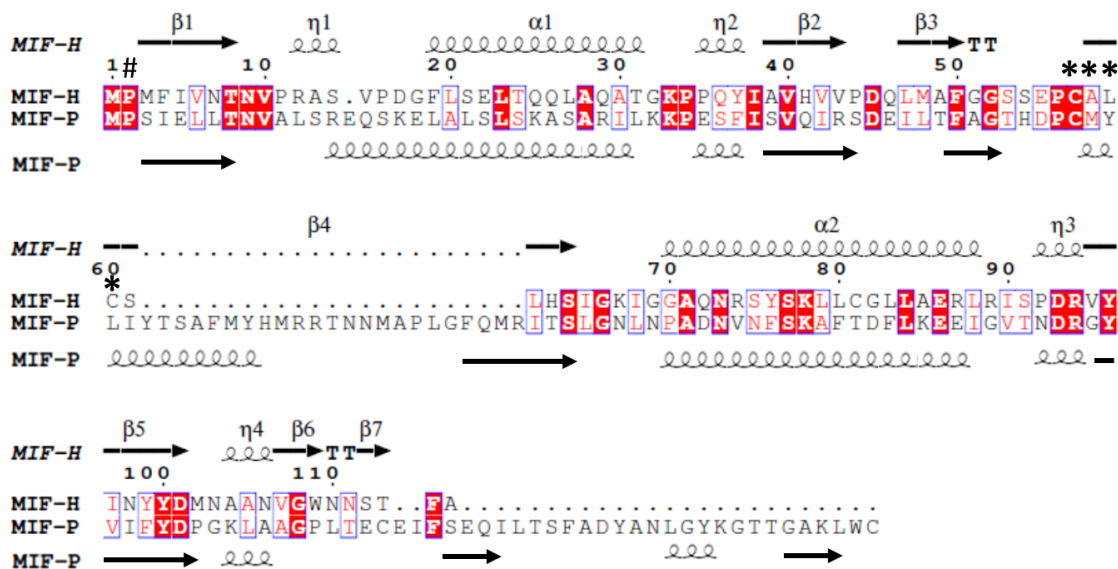


Figura 12. Análise comparativa das estruturas secundárias da MIF humana (MIF-H) e da MIF de *Paracoccidiodies* (MIF-P). As análises foram realizadas utilizando os servidores ESPrpt e PSIPred. A numeração dos resíduos de aminoácidos e de estruturas secundárias está baseada na MIF-H. O símbolo # representa o resíduo conservado de prolina e o * representa o sítio CXXC.

Podemos observar na **Figura 12** que as estruturas secundárias da MIF humana (MIF-H) e as preditas para a MIF de *Paracoccidiodies* (MIF-P) são sobrepostas, com duas exceções: i) a fita- β 4 da MIF-H que é substituída por uma região maior (entre os resíduos 60 e 80 em MIF-P) predita por ser composta por uma α -hélice e uma fita- β ; e ii) a região C-terminal da MIF-P é bem mais longa que a de MIF-H sendo composta por duas fitas- β e uma α -hélice.

Como já mencionado na revisão bibliográfica desse trabalho, a MIF humana e de outros organismos apresenta duas funções catalíticas: tautomerase e tiol-proteína oxidorreductase.

A atividade tautomerase de MIF está relacionada ao resíduo de prolina N-terminal. Na MIF humana, esse resíduo de Pro está localizado na fita- β 1 que faz parte da folha- β central formada por outras três fitas β (β 2, β 4 e β 5) que não é apenas um elemento central do monômero de MIF, mas também está envolvida na oligomerização por interações com subunidades adjacentes (SUN et al., 1996b). A MIF-P também possui esse resíduo de Pro conservado na mesma posição (**Figura 11**), o que indica que esta proteína também deve exercer a função tautomerase.

Rosengren e colaboradores (1997) estudaram a atividade tautomerase de MIF para os substratos fenilpiruvato e p-hidroxifenilpiruvato. Foi observado que, apesar destes substratos estarem envolvidos no metabolismo de fenilalanina em tirosina, os valores de Km obtidos foram altos quando comparados com as concentrações celulares destes compostos, e, portanto, pode ser que esse efeito catalítico de tautomerização não seja relacionado à função biológica de MIF. É possível que esta atividade enzimática seja vestígio de uma origem ancestral comum entre a MIF e suas proteínas homólogas, como a DDT (CALANDRA; ROGER, 2003)

A atividade enzimática de oxidorreductase identificada em MIF é mediada por seu motivo central CALC (Cys-Ala-Leu-Cys). Enzimas tiol-oxidorreductases estão envolvidas em reações de oxido-redução mediadas por dissulfetos e sua atividade catalítica é baseada na formação ou redução de uma ponte dissulfeto catalítica entre duas cisteínas vizinhas no motivo CXXC e, dependendo da estrutura tridimensional geral da proteína e dos resíduos vizinhos ao motivo CXXC, as enzimas tiol-oxidorreductases podem ter um potencial redox mais redutor ou mais oxidante (THIELE; BERNHAGEN, 2005). Observando o alinhamento de sequência primária da **Figura 12**, nota-se que a MIF-P não apresenta o motivo CXXC que a MIF-H apresenta. Além disso, observa-se, também, que o possível local desse sítio em MIF-P é seguido da longa sequência extra de resíduos de aminoácidos que a MIF-P possui em comparação à MIF-H.

A sequência primária da MIF de *Paracoccidioides* (MIF-P) também foi submetida ao servidor de predição de estrutura terciária I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). O I-TASSER (do inglês “*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*”) é uma abordagem hierárquica para a predição da estrutura da proteína e anotação de função baseada na estrutura. Ele primeiro identifica modelos estruturais do PDB, com modelos atômicos completos construídos por simulações interativas de montagem de fragmentos com base em modelo. O I-TASSER também faz predição de função do alvo a partir do alinhamento dos modelos 3D gerados com banco de dados de função de proteína.

Assim, após submissão da sequência primária da MIF-P, o I-TASSER calculou cinco modelos classificados de acordo com um C-score, que mede quantitativamente a confiança de cada modelo. A pontuação C está normalmente na faixa de [-5, 2], em que uma pontuação C de um valor mais alto significa um modelo com uma confiança mais alta e vice-versa.

O modelo 1, apresentado abaixo, foi o que apresentou o maior C-score (-0.80). Nele podemos observar as duas hélices antiparalelas que se compactam sobre uma folha- β formada pelas fitas β_1 , β_2 e β_3 . Além disso, podemos observar o segmento C-terminal adicional presente na MIF de *Paracoccidioides* formado por uma α -hélice (**Figura 13**).

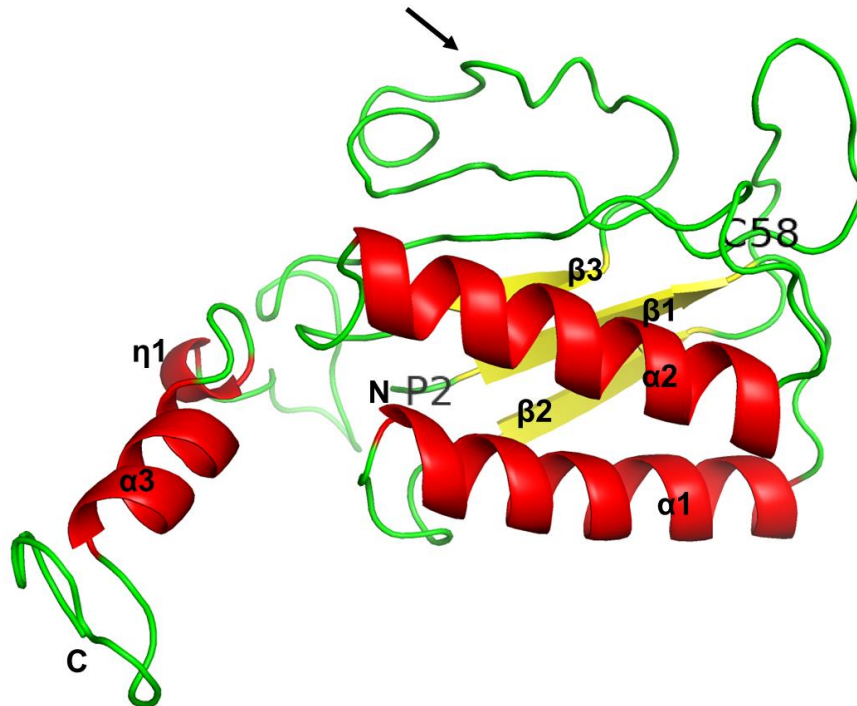


Figura 13. Modelo tridimensional predito para a MIF de *Paracoccidioides* através do servidor I-TASSER. A figura foi gerada através do programa Pymol. As estruturas secundárias numeradas por inspeção visual da estrutura tridimensional no Pymol. N e C correspondem às extremidades N- e C-terminal do modelo. A seta aponta para a região entre os resíduos 60 e 80 de MIF que não apresenta correspondente na MIF humana. P2 – resíduo de prolina na posição 2; C58 – resíduo de cisteína na posição 58, potencial sítio CXXC.

Comparando as estruturas secundárias apresentadas pelo modelo gerado pelo I-TASSER e a predição realizada pelo PSIPRED (apresentadas na **Figura 12**) observamos algumas diferenças, especialmente na região C-terminal, onde o PSIPRED previu uma fita- β adicional e na região entre os resíduos 60 e 80 (seta na **Figura 12**), que o PSIPRED previu como sendo constituído por uma hélice e uma fita- β e que o modelo 3D apresenta como uma região de voltas. De forma geral, ambas as predições se correlacionam nas regiões mais conservadas da sequência da MIF, especialmente porque esses programas de predição baseiam-se em sequências e estruturas homólogas.

O programa I-TASSER também apresenta, como resultado, as estruturas proteicas mais similares (do ponto de vista estrutural) ao modelo gerado, classificando tais estruturas das mais para as menos similares através de uma pontuação (TM-score), sendo o maior score para a proteína mais similar estruturalmente. Na tabela 2 observamos a lista das dez proteínas mais similares estruturalmente à MIF.

Tabela 2. Resultado do alinhamento estrutural entre o modelo previsto pelo I-TASSER para a MIF de Paracoccidioides (MIF-P) e as proteínas com estruturas conhecidas depositadas no PDB.

Posição ^(a)	Código PDB ^(b)	TM-score ^(c)	RMSD ^(d)	IDEN. ^(e)	Cov. ^(f)	Organismo
1	6lkv	0.783	2.06	0.220	0.849	<i>Oncomelania hupensis</i>
2	3gac	0.672	1.32	0.231	0.705	<i>Plasmodium yoelii</i>
3	1uiz	0.659	1.33	0.261	0.693	<i>Xenopus Laevis</i>
4	2os5	0.658	1.81	0.169	0.705	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>
5	2xcz	0.656	1.09	0.237	0.687	<i>Prochlorococcus marinus</i>
6	1gcz	0.655	1.68	0.246	0.699	<i>Homo sapiens</i>
7	1mff	0.653	1.34	0.272	0.687	<i>Mus musculus</i>
8	4dh4	0.652	1.15	0.246	0.687	<i>Toxoplasma gondii</i>
9	1hfo	0.643	1.37	0.265	0.681	<i>Trichinella spiralis</i>
10	6cuq	0.640	1.24	0.195	0.681	<i>Entamoeba histolytica</i>

^(a) A posição refere-se à classificação das proteínas estruturalmente semelhantes baseada na pontuação TM do alinhamento estrutural entre a estrutura de consulta (modelo previsto para a MIF-P pelo I-TASSER) e estruturas conhecidas do bando de dados PDB.

^(b) Código PDB da proteína estruturalmente semelhante seguida da cadeia dessa proteína que foi alinhada à MIF-P.

^(c) Proteínas com a pontuação TM-score mais alta têm a semelhança estrutural mais próxima compara com o modelo I-TASSER previsto.

^(d) RMSD do inglês “*Root Mean Square deviation*”, é o valor médio para o desvio médio dos átomos de uma estrutura X, relativamente a uma segunda estrutura Y. Quanto maior este valor, maior é a diferença estrutural entre as proteínas ou estruturas que estão sendo comparadas.

^(e) IDEN é a porcentagem de identidade de sequência na região estruturalmente alinhada.

^(f) Cov representa a cobertura do alinhamento realizado pelo I-TASSER e é igual ao número de resíduos estruturalmente alinhados dividido pelo comprimento da proteína de consulta.

As estruturas das duas primeiras proteínas dessa lista, 6LKV (MIF de *Oncomelania hupensis*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma japonicum*) e 3GAC (MIF de *Plasmodium yoelii*), juntamente com a 1GCZ (MIF humana) foram alinhadas com o modelo de MIF para observamos a sobreposição estrutural dessas proteínas (**Figura 14**).

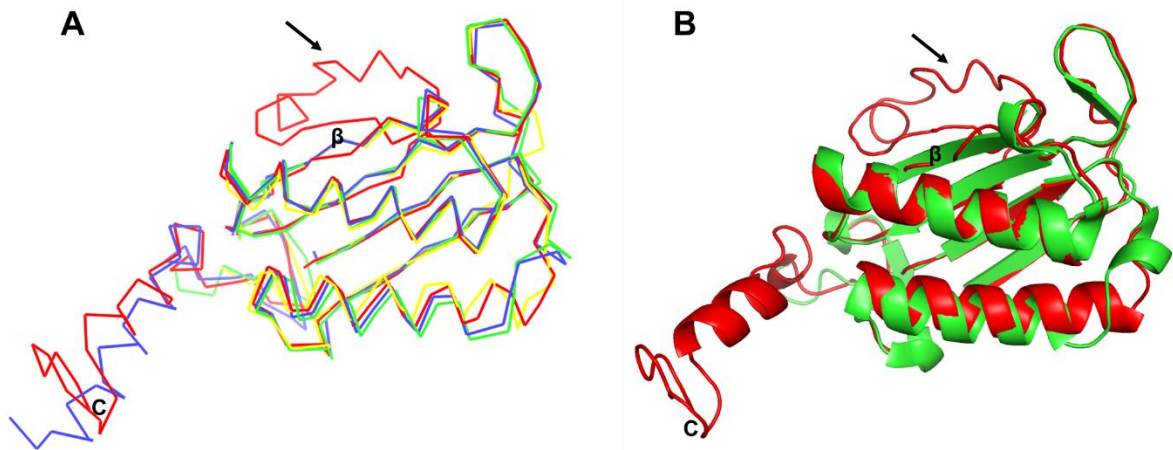


Figura 14. Alinhamento estrutural entre o modelo predito para a MIF de *Paracoccidioides* (vermelho), 6LKV (azul), 3GAC (amarelo) e 1GCZ (verde). A – alinhamento estrutural entre as quatro estruturas. As estruturas proteicas estão representadas na forma de linhas para melhor visualização do alinhamento estrutural. B – alinhamento estrutural entre o modelo para MIF-P e a estrutura 1GCZ (MIF-humana). C representa a extremidade C-terminal de MIF-P. A seta preta aponta para uma região de baixo alinhamento estrutural. A região marcada por β representa a quarta fita- β da MIF-humana que forma a folha- β central da estrutura. Figura produzida no programa Pymol.

Pelo alinhamento estrutural apresentado na **Figura 14A**, observamos boa correlação estrutural entre as quatro estruturas tridimensionais, com exceção da região apontada pela seta (resíduos 60 a 80 de MIF-P), que não apresenta similaridade estrutural com as outras proteínas. No entanto, a região C-terminal que não correlacionava com a MIF humana, aqui apresenta boa correlação com a MIF de *Oncomelania hupensis*.

Observando o alinhamento de seqüências entre as seqüências primárias das quatro proteínas (**Figura 15**), observamos que todas elas apresentam a Prolina na posição 2 relacionada à função tautomerase. No entanto, o sítio CXXC, relacionado à função tiol-proteína oxidorreductase, representado pela seqüência CALC na MIF-H (1GCZ) está ausente nas outras três proteínas. Mais ainda, somente a MIF-P apresenta a região adicional já destacada nas **figuras 13 e 14**.

MIF-P	MPSIELLTNVALSREQSKE-LALSLSKASARILKKPESFISVQIRSD EILTFAGTHDPCM	59
6LKV	MPV--ITVNTNVAEKSIPVFFQAALTNMMTKALQKPKEVMFVDLRSGANIMMGGDRNFCV	58
3GAC	MPCCELITNISIPDD-KAQNALSEIEDAISNVLGKPVAYIMSNYDYQKNLRFSGSNEGVC	59
1GCZ	MPMFI--VNTNVPRASVPDGF LSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCA	58
	** . * : : . : . ** : . : : * :	
MIF-P	YLLIYTSAFMYHMRRRTNNMAPLGFQMRITSLGNLNPADNVNFSKAFTDFLKEEIGVTNDRG	119
6LKV	FA-----TVECIGRLNPTSNLAMARDMEDMFIEHLNVRRI	95
3GAC	FV-----RLTSIGGINRSNSSLADKITKILSNHLGVKPRRV	96
1GCZ	LC-----SLHSIGKIGGAQNRYSKLLCGLLAERLRISPDRV	95
	: : * : . : * : : : : : *	
MIF-P	YVIFYDPGKLAAG---PLTECEIFSEQILTSFADYANLGYKGTGAKLWC	166
6LKV	VIRFIPVPALFCSFNALHDVSIERDEDIISQAI AEYLHHHHHHHA----	141
3GAC	YIEFRDCSAQNFAFSGSLFGL E-----	118
1GCZ	YINYYDMNAANVGWNNSTFALE-----HHHHHH-----	123
	: : . .	

Figura 15. Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas MIF de *Paracoccidioides* (MIF-P), de *Oncomelania hupensis* (6LKV), de *Plasmodium yoelii* (3GAC) e humana (1GCZ). O alinhamento foi realizado utilizando o software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Em verde, destaque para a Pro2; em vermelho, o potencial sítio CXXC e, pontilhado em azul, a sequência de resíduos adicionais exclusiva de MIF-P.

Observando especificamente o alinhamento estrutural entre o modelo da MIF de *Paracoccidioides* (MIF-P) e a MIF humana (MIF-H) (**Figura 13B**), observamos que a quarta fita- β da folha- β central da estrutura da MIF humana não apresenta estrutura secundária correlata em MIF-P, sendo, que em sua posição, encontra-se uma região de voltas em MIF-P correspondente aos resíduos 120 a 125 (GYINYYD). É interessante notar que esta região foi predita como sendo correspondente a uma fita- β pelo PSIPRED (**Figura 15**). A folha- β formada pelas quatro fitas- β da MIF humana é um elemento estrutural responsável pela oligomerização das subunidades da estrutura quaternária dessa proteína. Resta saber se, assim como no modelo predito pelo I-TASSER, a MIF-P realmente não apresenta esta quarta fita- β desta folha- β central e qual o impacto disso na formação de estruturas quaternárias.

Espera-se que diferenças nas estruturas tridimensionais das proteínas MIF humana e de *Paracoccidioides* sp. devam ser suficientes para o desenvolvimento de fármacos bastante específicos. Tais inibidores poderiam ser desenhados estruturalmente a partir do sítio ativo da MIF ou do substrato ou a partir da modificação de inibidores já conhecidos como o ISO-1, 4-IPP e a curcumina (CHAUHAN;

SHARMA; HOTI, 2015; SOMMERVILLE et al., 2013). Para isso ocorrer é necessário o estudo bioquímico e estrutural dessa proteína a fim de identificar suas características particulares em *Paracoccidioides* sp. Antes, porém, a proteína deve ser produzida em quantidade e qualidade para tais estudos serem possíveis.

5.2- Expressão heteróloga

5.2.1- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* BL21(DE3)

A bactéria *E. coli* BL21(DE3) é a cepa mais utilizada para a expressão de proteínas recombinantes. Ela dispõe da vantagem de alta quantidade de expressão com um tempo reduzido de indução, em razão de ausência das proteases Lon e OmpT (ROSANO; CECCARELLI, 2014a). Para a expressão da proteína MIF por bactérias *E. coli* B21(DE3), um teste padrão foi realizado utilizando indução com 0,5 mmol.L de IPTG por 4 horas a 37 °C. Como pode ser observado na **Figura 16**, a MIF foi expressa em grande quantidade, contudo, totalmente no extrato insolúvel.

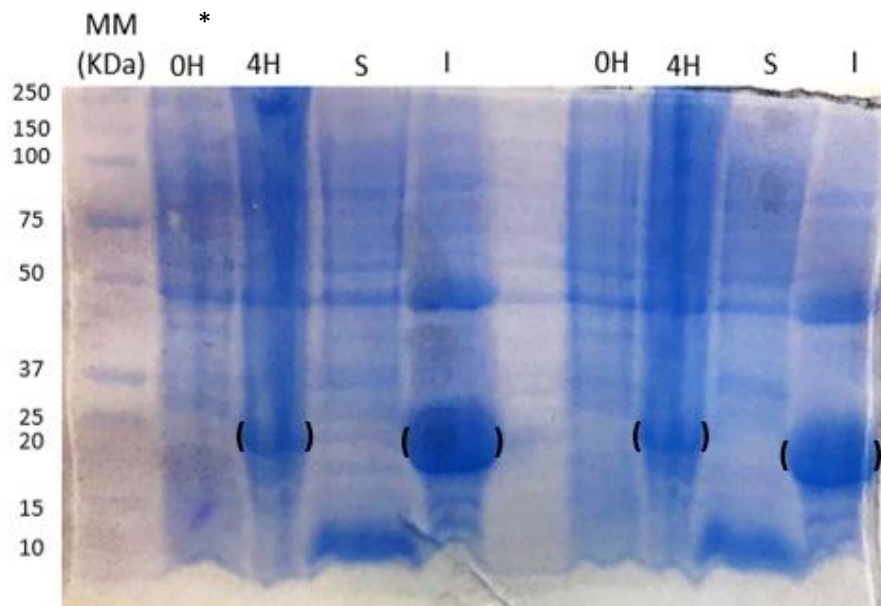


Figura 16 . SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise de MIF em *E. coli* BL21(DE3). MM – marcador molecular; 0H – precipitado do MIF BL21 antes da indução; 4H - precipitado do MIF BL21 após 4 horas de indução; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana de MIF BL21; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Dessa forma, foram avaliadas alternativas possíveis para alterações no protocolo, de forma que a proteína recombinante fosse expressa na fração solúvel.

- Indução – o tempo de indução pode levar a uma maior ou menor produção da proteína recombinante;
- Temperatura – as mudanças na temperatura podem interferir na taxa de alongamento da cadeia polipeptídica. A diminuição da temperatura proporciona que as chaperonas bacterianas protejam a cadeia polipeptídica crescente e auxiliem na enovelamento correto (LEBENDIKER; DANIELI, 2014);
- Indutor – a concentração do IPTG afeta a produção de mRNA e influencia a concentração local de cadeias polipeptídicas nascentes. As concentrações reduzidas do indutor podem impossibilitar a agregação das cadeias em crescimento enquanto ainda estão no polissoma (LEBENDIKER; DANIELI, 2014);
- Lise celular – o tempo de sonicação, a temperatura de congelamento e descongelamento e o tampão de lise podem influenciar na solubilidade da proteína recombinante.

Visto que a MIF estava sendo expressa na fração insolúvel, foi realizado um novo teste com a cepa BL21(DE3) utilizando indução com $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG por 24 horas a $18 \text{ }^\circ\text{C}$, onde a MIF foi também expressa apenas no extrato insolúvel (**Figura 17**).

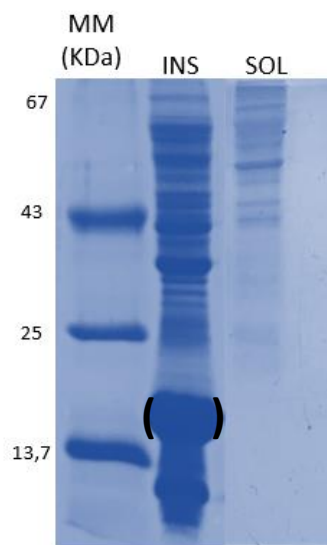


Figura 17. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 24 horas e lise de MIF em *E. coli* BL21(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); INS - amostras da fração insolúvel da lise

bacteriana de MIF BL21; SOL – amostras da fração solúvel da lise bacteriana de MIF BL21; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Para que pudesse seguir com os testes de renaturação da proteína MIF a partir da sua fase insolúvel, a amostra foi submetida a um *Western blot* utilizando anticorpo anti-cauda de histidinas para confirmação da expressão, como mostrado da **figura 18**. A revelação da membrana de PVDF mostrou a expressão do MIF apenas em sua fração insolúvel.

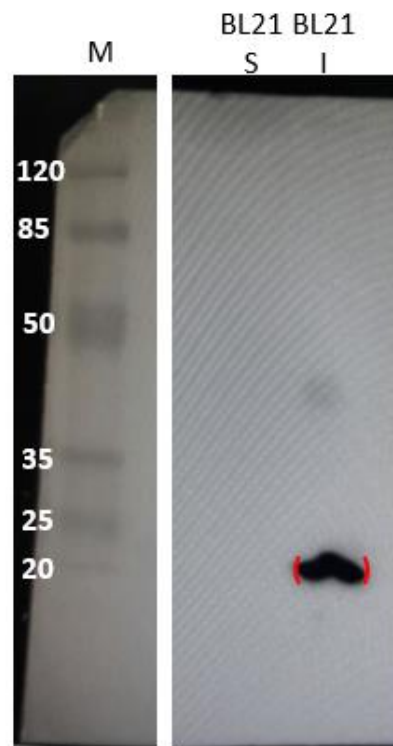


Figura 18. *Western blot* da expressão heteróloga com indução por 24 horas de MIF em *E. coli* BL21(DE3). M – Marcador molecular *Pierce*™ “*Prestained Protein MW Marker*” (ThermoFisher Scientific); I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana de MIF BL21; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF BL21; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Dessa forma, todas as abordagens avaliadas para a cepa BL21 resultaram na produção do MIF na fração insolúvel da lise bacteriana. Consequentemente, decidiu-se solubilizar a fração insolúvel, obtida após a expressão em BL21 com indução por 4h a 37 °C, com ureia (8 mol.L⁻¹), purificar a proteína MIF e renaturá-la durante a purificação (renaturação em coluna) a fim de obter essa proteína funcionalmente ativa.

Assim, o extrato insolúvel solubilizado em ureia foi submetido à cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} , com um gradiente decrescente de ureia, onde as frações obtidas foram analisadas em SDS-PAGE 15 % como mostrado na **Figura 19**.

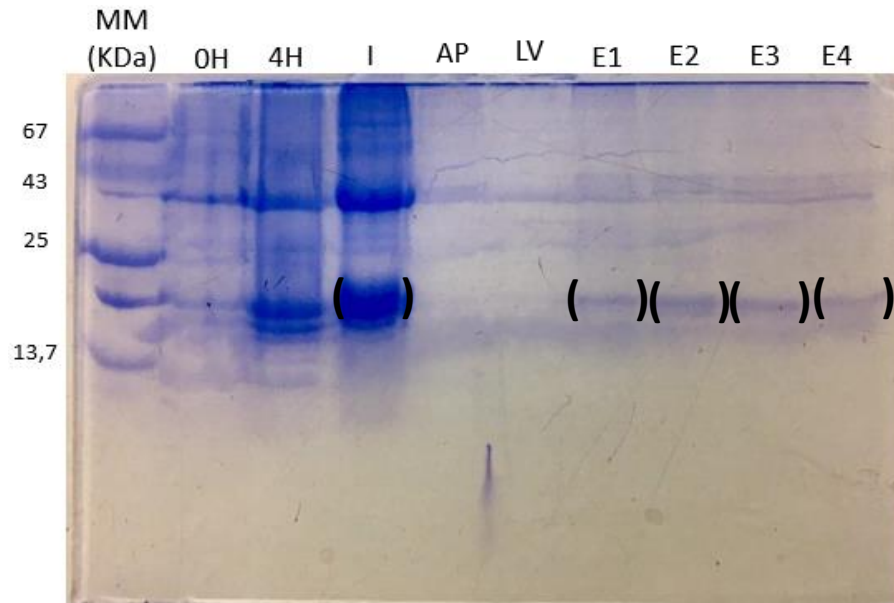


Figura 19. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Ni^{2+} com renaturação em coluna de MIF expressa em *E. coli* BL21(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF BL21 com 0 horas de indução; 4H - precipitado do MIF BL21 com 4 horas de indução; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF BL21; AP – fração obtida durante a aplicação da fração insolúvel na coluna cromatográfica; LV – fração obtida durante a lavagem da coluna de cromatografia; E1, E2, E3 e E4 – frações obtidas da eluição da fração insolúvel na coluna cromatográfica, com concentração de imidazol a 300 mmol.L^{-1} e gradiente decrescente de ureia (E1 - 4 mol.L^{-1} , E2 - 2 mol.L^{-1} , E3 - 1 mol.L^{-1} e E4 - 0 mol.L^{-1}); Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Como visto na **figura 19**, quando submetida à cromatografia por afinidade, a MIF mostrou interagir com a coluna de níquel e conseqüentemente foi eluída após o gradiente de ureia e concentração final de imidazol de 300 mmol.L^{-1} . No entanto, a proteína MIF apresentou-se em pequenas quantidades nessas frações (bandas destacadas no gel SDS-PAGE). Para que se pudesse realizar os ensaios futuros de confirmação da expressão da proteína MIF, as frações foram concentradas em tubos Vivaspin. No entanto, ao analisar a amostra que ficou retida e a que passou pela membrana, não conseguimos observar qualquer banda correspondente à MIF (**Figura 20**).

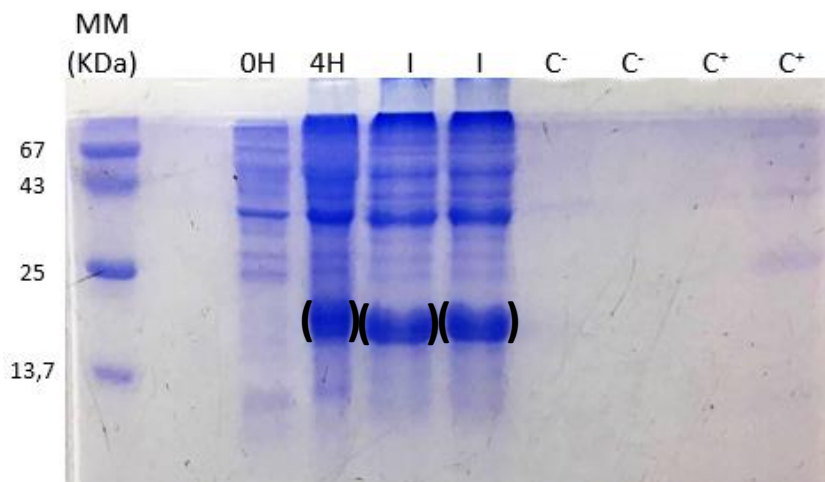


Figura 20. SDS-PAGE 15 % da concentração da fração insolúvel de MIF em *E. coli* BL21(DE3) após cromatografia de afinidade. MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF BL21 com 0 horas de indução; 4H - precipitado do MIF BL21 com 4 horas de indução; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana de MIF BL21; C- : Amostra que passou pelo filtro; C+ : Amostra que ficou retida no filtro; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Ainda assim, um novo teste, com o extrato insolúvel de amostras induzidas por 72 horas a 18 °C, foi executado na tentativa de solubilização com ureia (6 mol.L⁻¹). Assim, o extrato insolúvel solubilizado em ureia foi submetido à cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺ com concentração crescente de imidazol (50, 100, 200 e 300 mmol.L⁻¹) para purificação e renaturação posterior. As frações obtidas foram analisadas em SDS-PAGE 15 % como mostrado na **Figura 21**.

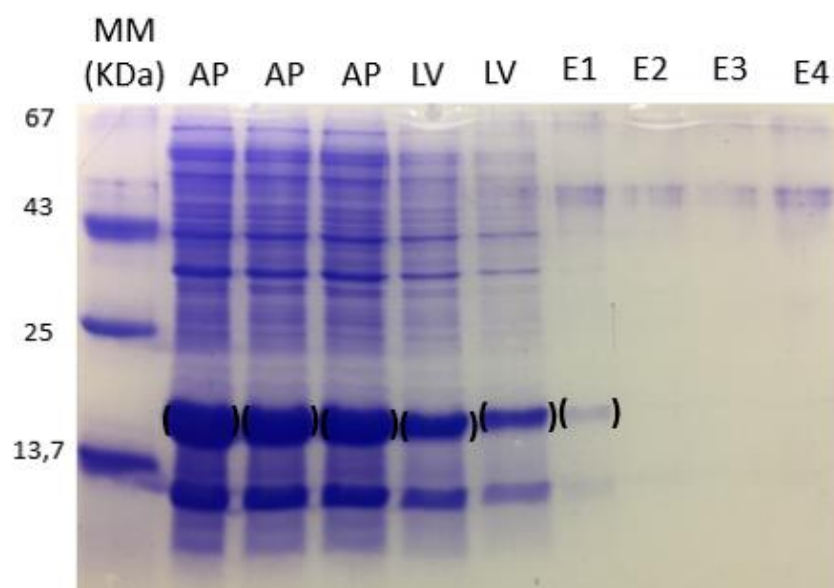


Figura 21. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Ni²⁺ de MIF em *E. coli* BL21(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); AP – amostra da aplicação da fração

insolúvel na coluna cromatográfica; LV – amostra da lavagem da coluna de cromatografia; E1 - amostra da eluição da fração insolúvel na coluna cromatográfica com concentração final de imidazol a 50 mmol.L⁻¹, E2- amostra da eluição da fração insolúvel na coluna cromatográfica com concentração final de imidazol a 100 mmol.L⁻¹, E3 - amostra da eluição da fração insolúvel na coluna cromatográfica com concentração final de imidazol a 200 mmol.L⁻¹e E4 – amostra da eluição da fração insolúvel na coluna cromatográfica com concentração final de imidazol a 300 mmol.L⁻¹; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Observamos que, quando submetida a cromatografia por afinidade, MIF mostrou não interagir com a coluna de níquel e conseqüentemente não foi purificada quando analisada em gel SDS-PAGE 15 %. Assim, levando em consideração os resultados obtidos por testes com a cepa BL21(DE3) e as dificuldades inerentes à renaturação, decidiu-se alterar a cepa com o propósito de obter expressão da proteína recombinante em sua fração solúvel.

5.2.2- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* ArcticExpress(DE3)

Como uma alternativa para melhorar a solubilidade da proteína MIF, a bactéria *E. coli* ArcticExpress(DE3) foi utilizada. Essa cepa expressa duas chaperoninas, Cnp10 e Cnp60, que são funcionais a baixas temperaturas (4 a 13 °C) (ROSANO; CECCARELLI, 2014b).

A diminuição da temperatura, como já citado, pode conferir uma melhor solubilidade à proteína, mas, em contrapartida, pode diminuir a atividade das chaperonas. Contudo as chaperoninas presentes na cepa ArcticExpress(DE3) contornam este problema, uma vez que são ativas à baixas temperaturas, permitindo a expressão da proteína alvo com maior solubilidade e em temperaturas mais baixas (BESSETTE et al., 1999; FERRER et al., 2004).

Os testes de expressão de MIF em *E. coli* ArcticExpress(DE3) foram avaliados em diferentes condições de temperatura, tempo de indução, concentração do indutor e condições de lise celular. Um teste inicial foi feito seguindo o manual da cepa disponibilizado pela empresa, sendo a indução realizada 24 horas a 12 °C e duas concentrações de indutor: 0,1 e 0,5 m.mol⁻¹.

A análise dos resultados da expressão da cepa ArcticExpress(DE3) é mostrada no gel SDS-PAGE 15 % na **Figura 22**, onde observamos que a proteína

mostrou ser expressa na fração insolúvel e aparentemente uma baixa expressão na fração solúvel.

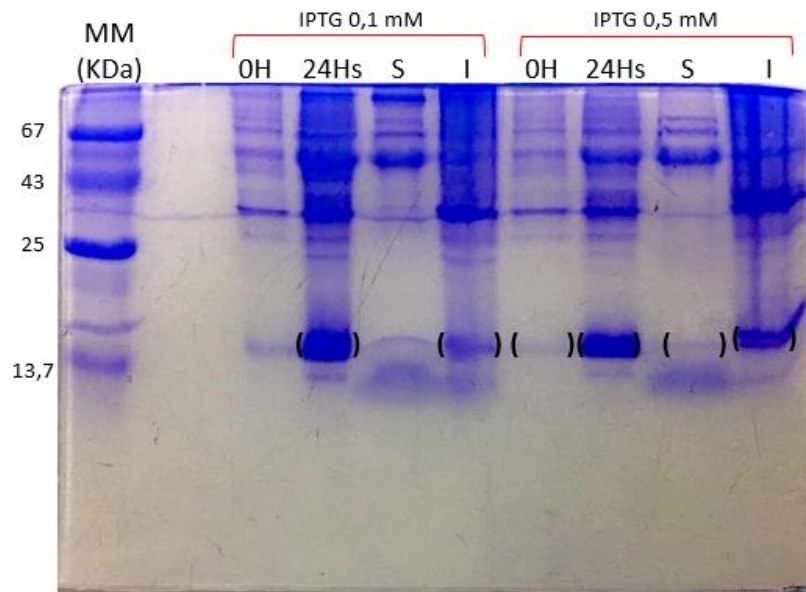


Figura 22. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 24 horas e lise de MIF em *E. coli* ArcticExpress(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF ArcticExpress com 0 horas de indução; 24H - precipitado do MIF ArcticExpress com 24 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF ArcticExpress; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF ArcticExpress; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

De acordo com análises do gel de SDS-PAGE, **figura 22**, a proteína MIF pode ter aparecido na fração solúvel, logo esta amostra solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} , com gradiente crescente de imidazol, e as frações obtidas foram analisadas em SDS-PAGE 15 % como mostrado na **Figura 23**. Não foi possível observar a banda correspondente à MIF nas frações obtidas após a eluição.

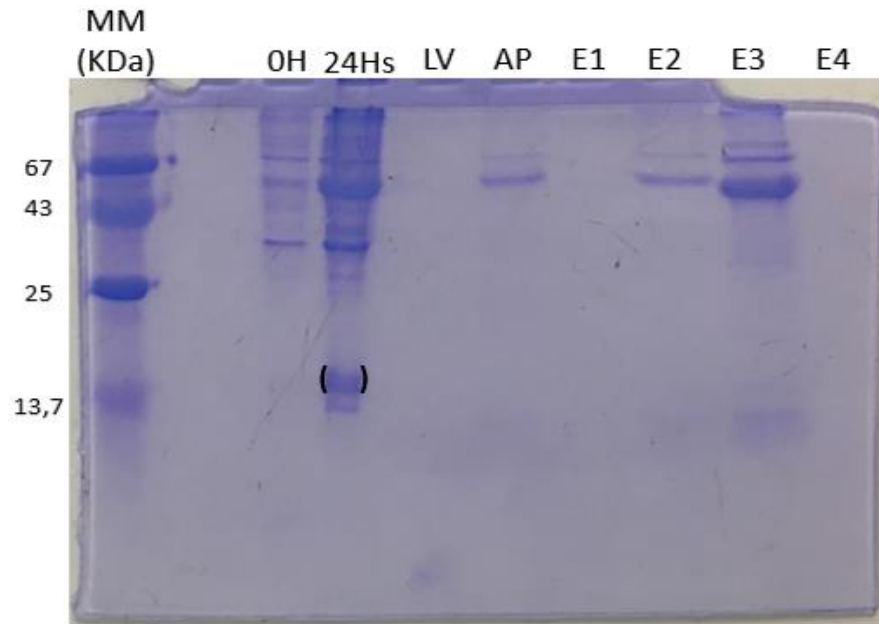


Figura 23. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Ni^{2+} de MIF em *E. coli* ArcticExpress(DE3) (extrato solúvel). MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF ArcticExpress com 0 horas de indução; 24H - precipitado do MIF ArcticExpress com 24 horas de indução; AP – amostra da aplicação da fração solúvel na coluna cromatográfica; LV – amostra da lavagem da coluna de cromatografia; E1 - amostra da eluição da fração solúvel na coluna cromatográfica com concentração final de imidazol a 50 mmol.L^{-1} , E2 - amostra da eluição da fração solúvel na coluna cromatográfica com concentração final de imidazol a 100 mmol.L^{-1} , E3 - amostra da eluição da fração solúvel na coluna cromatográfica com concentração final de imidazol a 200 mmol.L^{-1} e E4 – amostra da eluição da fração solúvel na coluna cromatográfica com concentração final de imidazol a 300 mmol.L^{-1} ; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Contudo, a ausência de MIF nas frações obtidas após a eluição poderia ser devido à baixa expressão da proteína. Assim, com o intuito de aumentar a quantidade de proteína, foram realizados novos testes de expressão da MIF, alterando o tempo de indução para 72 horas e aumentando a concentração final do indutor para 1 mmol.L^{-1} . O resultado de análise das frações do precipitado bacteriano por meio de gel SDS-PAGE 15 % é representado na **Figura 24**, onde observamos que, quando expressa a $12 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 horas, com 1 mmol.L^{-1} de indutor, a proteína mostrou uma maior expressão na fração insolúvel e nenhuma expressão na fração solúvel

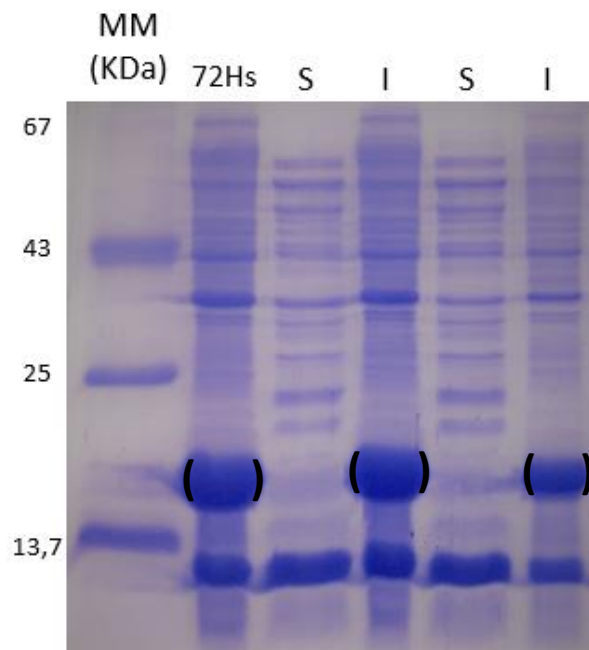


Figura 24. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 72 horas e lise do MIF em *E. coli* ArcticExpress(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF ArcticExpress com 0 horas de indução; 72H - precipitado do MIF ArcticExpress com 72 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF ArcticExpress; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF ArcticExpress; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Dessa forma, como a cepa continuava não expressando a proteína MIF no extrato solúvel, as amostras solúvel e insolúvel do teste de 72 horas de indução a 12 °C, foram submetidas à análise por meio de *Western blot* com anticorpo Anti-His, para que se pudesse confirmar a expressão da proteína heteróloga. A **figura 25** traz o resultado da revelação da membrana de PVDF. A membrana mostra a ligação do anticorpo com a proteína específica, comprovando que é a proteína MIF sendo expressa no extrato insolúvel. No entanto, nenhuma marcação na fração solúvel foi observada.

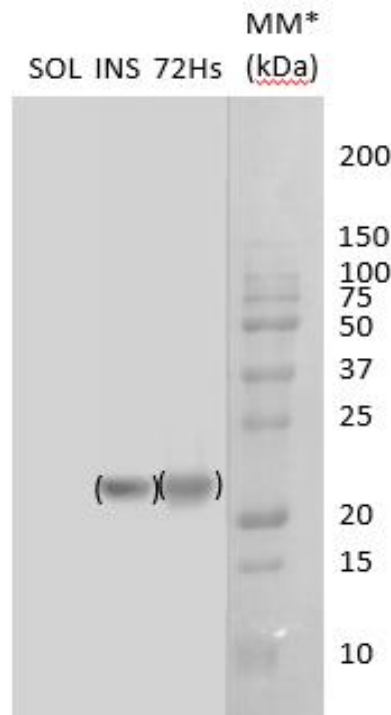


Figura 25. *Western blot* da expressão heteróloga a 72 horas de MIF em *E. coli* ArcticExpress(DE3). MM* – Marcador molecular Pierce™ “*Prestained Protein MW Marker*” (ThermoFisher Scientific); 72Hs – precipitado da expressão com 72 horas de indução; INS - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF BL21; SOL – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF BL21; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

As amostras da proteína no extrato insolúvel foram então submetidas a um teste com o intuito de solubilizar a fração insolúvel com ureia (6 mol.L^{-1}), purificar o MIF e renaturá-la a fim de obter essa proteína funcionalmente ativa. A **figura 26** representa o SDS-PAGE das frações obtidas após a purificação da amostra insolúvel de 72 horas com concentração final de IPTG a 1 mmol.L^{-1} (expressão que possuía uma quantidade adequada de proteína insolúvel para se executar o protocolo) em resina de Ni^{2+} . Observamos que a proteína MIF não mostrou interação com a coluna de Níquel, ou seja, não foi eluída, estando presente apenas na aplicação da amostra (AP) e na lavagem (LV).

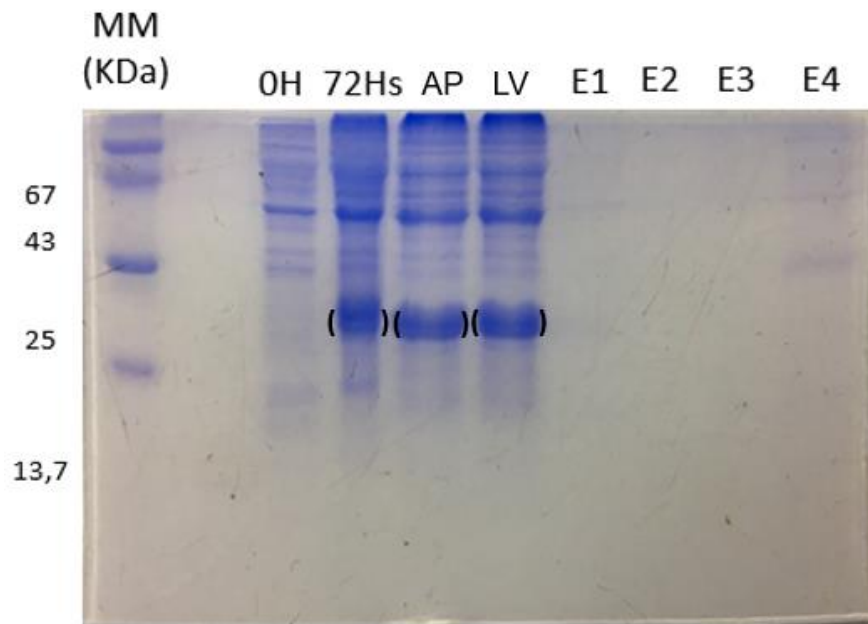


Figura 26. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Ni^{2+} de MIF em *E. coli* ArcticExpress(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF ArcticExpress com 0 horas de indução; 72H - precipitado do MIF ArcticExpress com 72 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF ArcticExpress; AP – amostra da aplicação da fração insolúvel na coluna cromatográfica; LV – amostra da lavagem da coluna de cromatografia; E1, E2, E3 e E4 – amostras da eluição da fração insolúvel na coluna cromatográfica; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

5.2.3- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* Rosetta(DE3)

A bactéria Rosetta(DE3) é utilizada para expressar proteínas que possuem códons raros. A Rosetta possui o plasmídeo pRARE com genes extras para os tRNAs de códons AGG/AGA (Arg), AUA (Ile), CCC (Pro) e GGA (Gly). Este fato pode influenciar na síntese e enovelamento da proteína, afetando a solubilidade (ROSANO; CECCARELLI, 2014b).

O primeiro teste realizado em cepa *E. coli* Rosetta(DE3) foi com uma indução com concentração final de $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG por 4 horas a 37°C . O resultado da expressão heteróloga de 4 horas a 37°C , apresentado na **figura 27**, demonstra uma baixa expressão da proteína no extrato insolúvel.

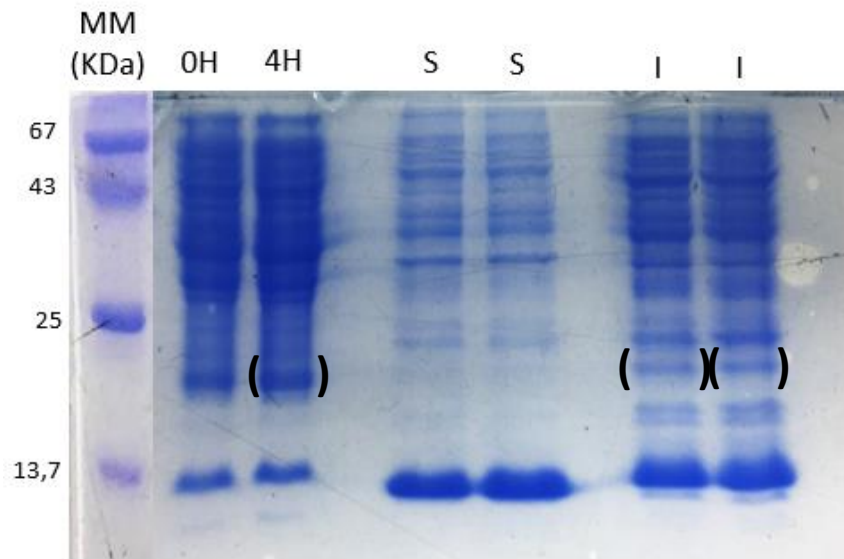


Figura 27. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise de MIF em *E. coli* Rosetta(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF Rosetta com 0 horas de indução; 4H - precipitado do MIF Rosetta com 4 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Devido a não expressão do MIF no extrato solúvel e baixas quantidades no insolúvel, optou-se então, por repetir o teste de expressão com indução de 4 horas, porém aumentando a concentração final de indutor para 1 mmol.L^{-1} . O resultado da análise das frações do pellet bacteriano por meio de gel SDS-PAGE 15 % é representado na **figura 28**. Assim, a concentração maior de IPTG contribuiu para uma expressão maior da proteína recombinante, porém, na fração insolúvel.

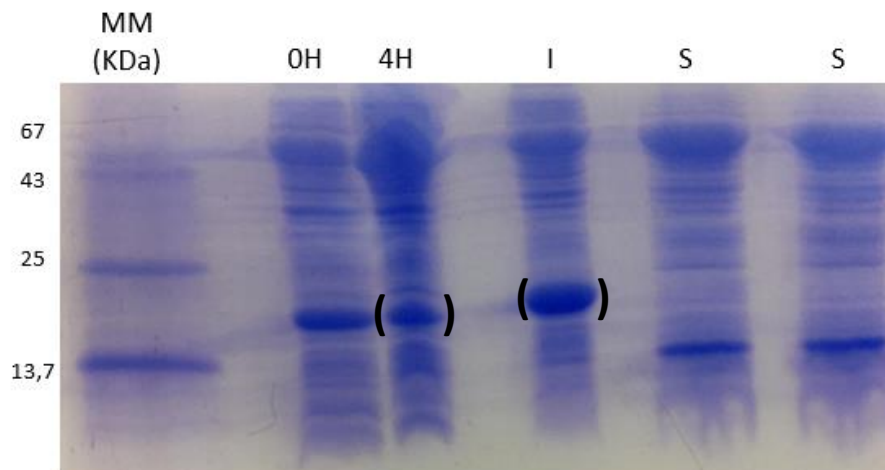


Figura 28. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise de MIF em *E. coli* Rosetta(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF Rosetta com 0 horas de indução; 4H - precipitado do MIF Rosetta com 4 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Visto que a concentração final de indutor a 1 mmol.L^{-1} proporcionou uma maior expressão da proteína recombinante, foram realizados novos testes utilizando esta concentração final de IPTG e aumentando o tempo de indução para 24 horas e diminuindo a temperatura de indução para $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com a finalidade de produzir maior quantidade e conferir uma melhor solubilidade à proteína recombinante. Mesmo com essas alterações, a proteína se mostrou em grande quantidade na fração insolúvel (**Figura 29**).

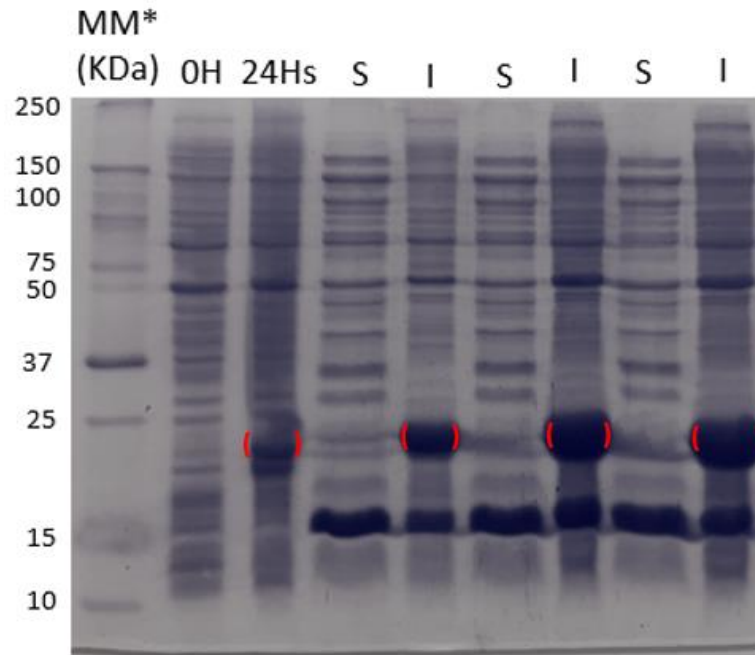


Figura 29. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 24 horas e lise do MIF em *E. coli* Rosetta(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF Rosetta com 0 horas de indução; 4H - precipitado do MIF Rosetta com 4 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Analisando o gel da **Figura 29**, observa-se que poderia haver uma expressão de MIF em sua fração solúvel, a amostra foi submetida a uma análise por meio de *Western blot* para confirmação da expressão, como mostrado da **figura 30**. A revelação da membrana de PVDF confirmou a expressão de MIF na fração insolúvel.

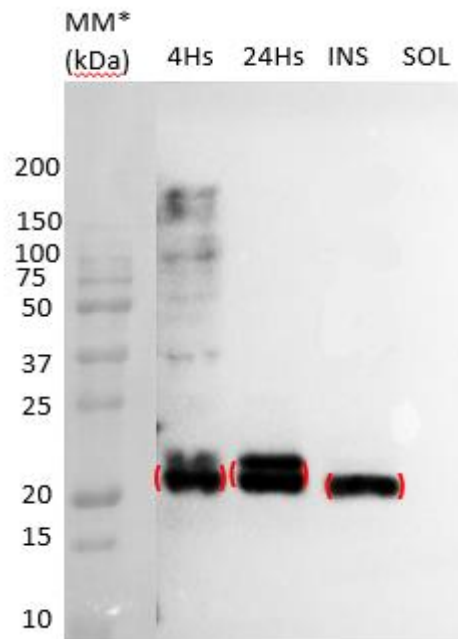


Figura 30. *Western blot* da expressão heteróloga a 24 horas do MIF em *E. coli* Rosetta(DE3). MM* – Marcador molecular *Pierce™ “Prestained Protein MW Marker”* (ThermoFisher Scientific); 4Hs – precipitado da expressão com 4 horas de indução; 24Hs – precipitado da expressão com 24 horas de indução; INS - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF BL21; SOL – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF BL21; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

O aumento do tempo provocou uma expressão favorável de proteína no extrato insolúvel, como visto na **Figura 28**, e uma não expressão do extrato solúvel. Sendo assim, o extrato insolúvel foi solubilizado com ureia (8 mol.L⁻¹) e submetido à purificação por afinidade. Dessa vez, alterou-se o protocolo para uma purificação “em batch” utilizando a resina de Co²⁺. As frações obtidas em cada etapa da purificação foram analisadas em SDS-PAGE 15 % como mostrado na **Figura 31**.

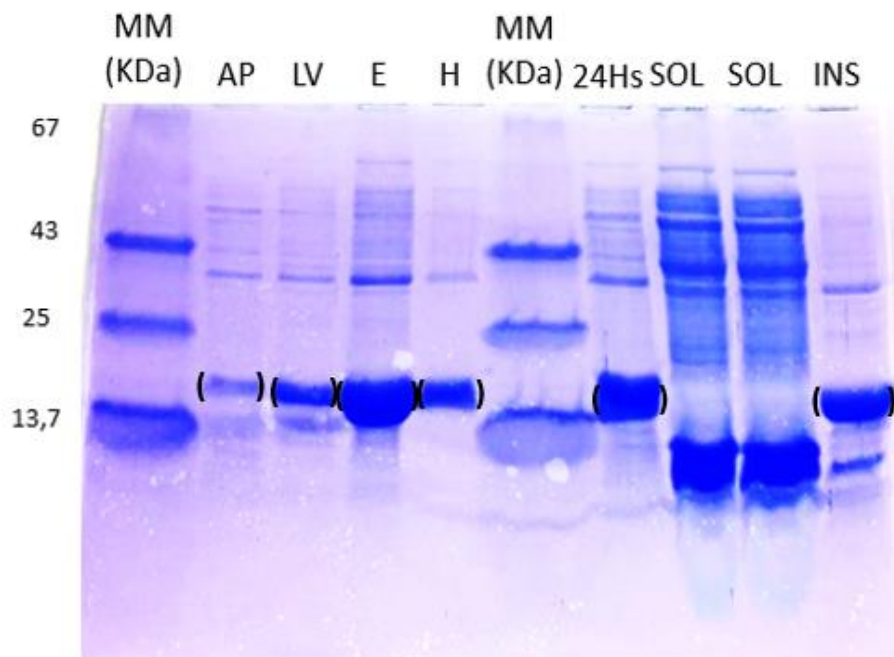


Figura 31. SDS-PAGE 15 % da purificação por afinidade em resina de Co^{2+} do MIF em *E. coli* Rosetta(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 24H - precipitado do MIF Rosetta com 24 horas de indução; INS – amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; SOL – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; AP – amostra da aplicação da fração insolúvel na coluna cromatográfica; LV – amostra da lavagem da coluna de cromatografia; E– amostras da eluição da fração insolúvel na coluna cromatográfica; H – amostra de água destilada utilizada para limpar a coluna cromatográfica após a eluição; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa

Como observado, a purificação “em batch” não se mostrou totalmente efetiva porque a proteína saiu durante todas as etapas da purificação: aplicação da amostra, lavagem, eluição com imidazol e lavagem final com água. No entanto, a amostra da proteína MIF eluída com imidazol foi levada ao Laboratório de Biologia Estrutural (BIOEST) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para que pudesse realizar a diálise, para a retirada do imidazol e ureia e, posteriormente, realizar testes de ELISA com soro de pacientes acometidos por PCM.

Isto posto, a amostra de eluição da cepa Rosetta(DE3) quando dialisada, para retirada de imidazol e conseqüentemente não interferência do mesmo no teste de ELISA, sofreu precipitação, como mostrado na **figura 32**. Assim sendo, o sobrenadante foi utilizado para o teste de ELISA e o precipitado foi armazenado para análise futura em SDS-PAGE 15 %.

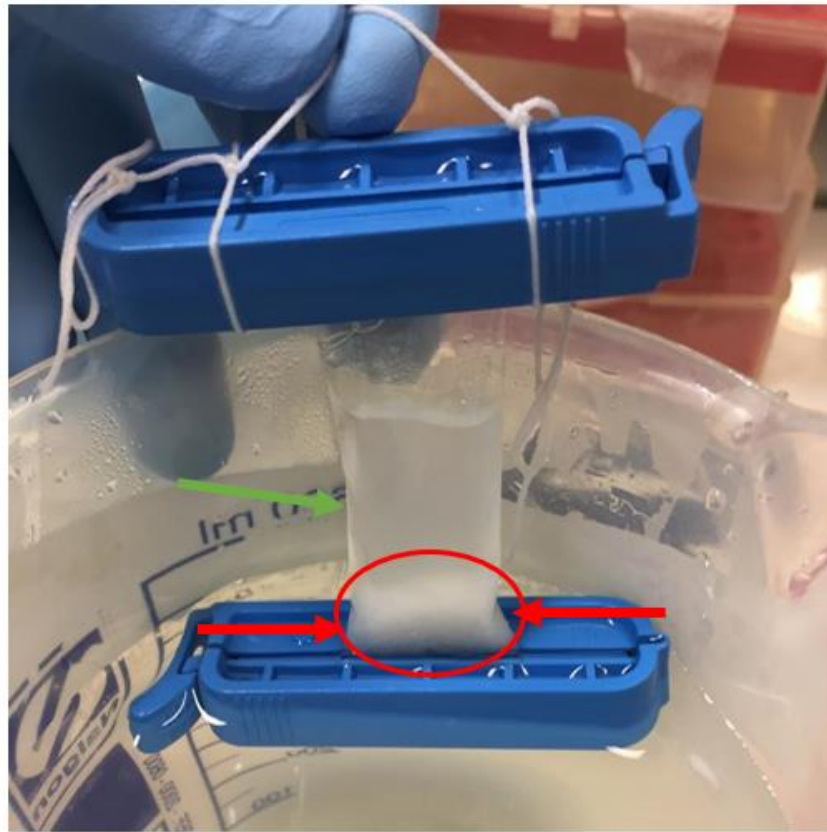


Figura 32. Imagem da precipitação da amostra insolúvel da cepa Rosetta(DE3) após diálise para retirada do imidazol. Setas e círculo em vermelho – precipitado da amostra; Seta em verde – sobrenadante utilizado no teste de ELISA.

Posteriormente à amostra do sobrenadante, foi retirada e utilizada como antígeno em ensaios de ELISA com soros de pacientes com PCM não tratados. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais e mostraram que o controle negativo apresentou leitura comparável ao soro de pacientes com PCM não-tratados (**Figura 33**), indicando que houve reação cruzada, provavelmente com as proteínas de *E. coli*, ainda presentes na amostra, uma vez que a amostra não estava efetivamente purificada e a proporção entre MIF e proteínas contaminantes estava muito baixa, devido à precipitação de MIF durante a diálise.

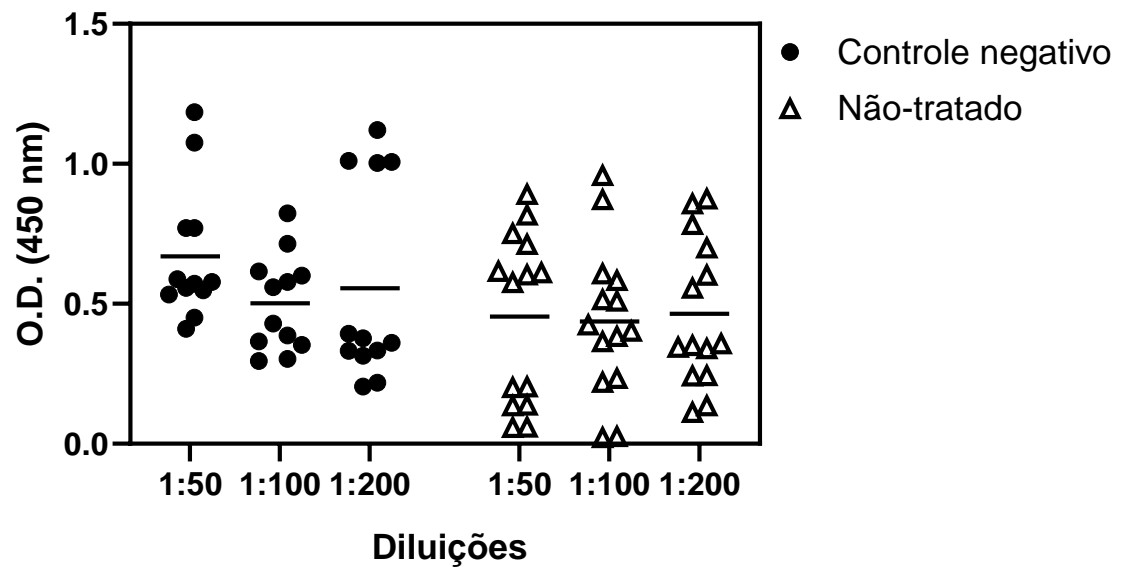


Figura 33. Reatividade de IgG humana à MIF. Para avaliar a reatividade do soro de pacientes com PCM à proteína MIF, esses soros foram avaliados por ELISA utilizando a proteína MIF como antígeno. Controle negativo: soro de pacientes saudáveis; Não-tratado: soro de pacientes com PCM não-tratados. Houve reatividade do controle negativo.

Com base nisso, foi feita uma análise por meio de SDS-PAGE 15 % para verificar se a proteína MIF estava realmente presente na amostra utilizada (sobrenadante que foi utilizado para execução do ELISA), com a finalidade de se entender e analisar todos os resultados obtidos. O resultado do gel SDS-PAGE 15 %, mostrado na **figura 34**, mostrou que a proteína recombinante MIF estava em mínimas quantidades na amostra do sobrenadante e que grande parte da proteína precipitou.

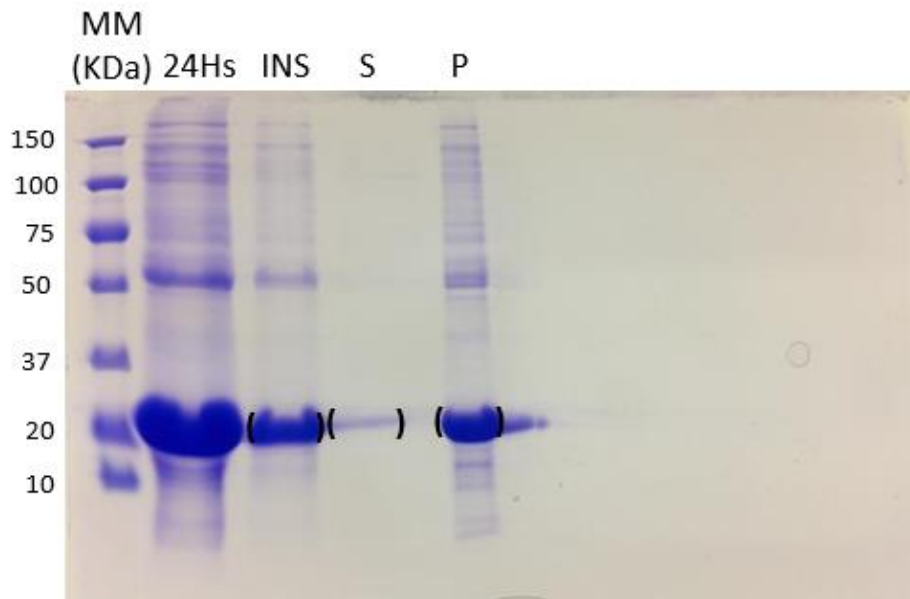


Figura 34. SDS-PAGE 15 % da diálise do MIF insolúvel em *E. coli* Rosetta(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 24H - precipitado do MIF Rosetta com 24 horas de indução; INS – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; S – amostras do sobrenadante do final da diálise da amostra do MIF Rosetta; P – amostra do precipitado (pellet) do final da diálise da amostra do MIF Rosetta; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa

5.2.4- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* C43(DE3)pLysS

A cepa de bactérias *E. coli* C43(DE3)pLysS é utilizada na expressão de proteínas tóxicas a todas as classes de organismos, possuindo mutações genéticas selecionadas fenotipicamente para conferir tolerância a essas proteínas.

Estas células além de serem deficientes nas proteases Lon e OmpT, transportam um plasmídeo resistente ao cloranfenicol que expressa uma pequena quantidade de lisozima T7, que suprime a expressão basal da RNA polimerase T7 antes da indução, estabilizando genes que codificam proteínas particularmente tóxicas.

Para a expressão da proteína MIF por bactérias *E. coli* C43(DE3)pLysS, um teste padrão foi realizado utilizando indução com 1 mmol.L⁻¹ de IPTG por 4 horas a 37 °C. Como pode ser observado na **figura 35**, a MIF foi expressa em quantidades não consideráveis, conseqüentemente não apresentando a banda de peso molecular (21,5 kDa) no gel SDS-PAGE 15 %.

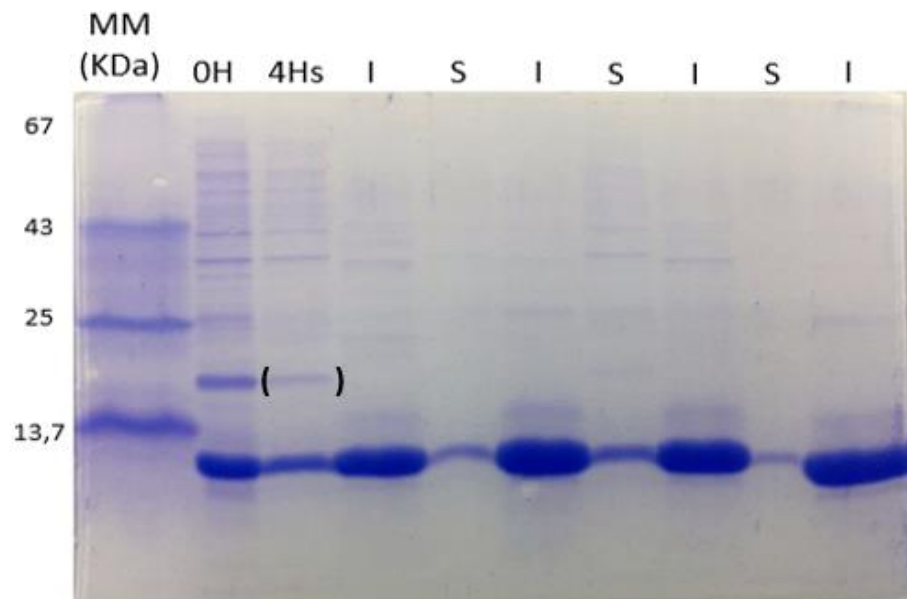


Figura 35. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise do MIF em *E. coli* C43(DE3)pLysS. MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF C43 com 0 horas de indução; 4Hs – precipitado do MIF C43 com 4 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF C43; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF C43; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Contudo, decidiu-se alterar o teste padrão aumentando o tempo de expressão da proteína MIF por bactérias *E. coli* C43(DE3)pLysS, utilizando indução com 1 mmol.L de IPTG por 18 horas a 37 °C. Como pode ser observado na **figura 36**, a MIF não foi expressa no extrato solúvel e em pouca quantidade no extrato insolúvel.

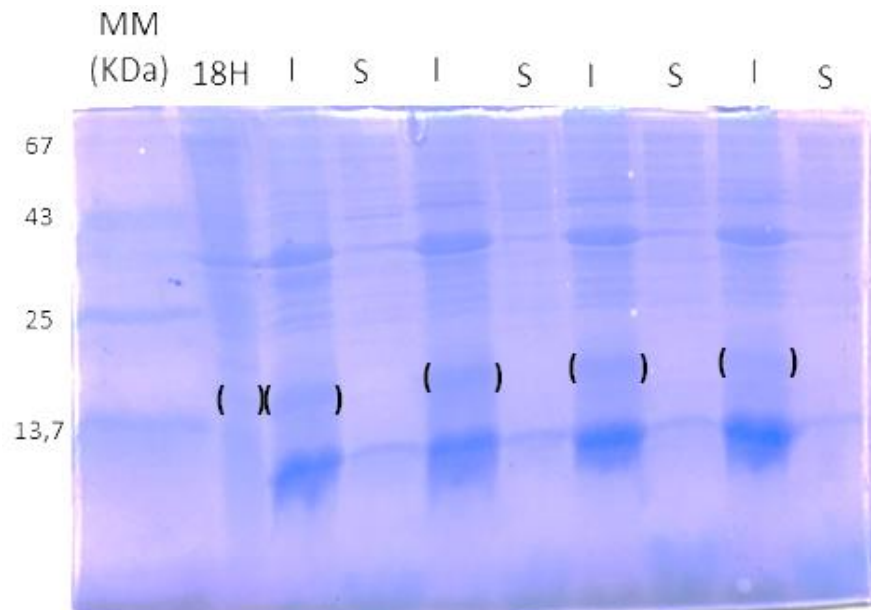


Figura 36. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 18 horas e lise do MIF em *E. coli* C43(DE3)pLysS. MM – marcador molecular (LBBMP); 18Hs – precipitado do MIF C43 com 18 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF C43; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF C43; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

5.2.5- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* Lemo21(DE3)

Ainda como alternativa para expressão da proteína recombinante MIF em sua fração solúvel, a bactéria *E. coli* Lemo21(DE3) oferece os mesmos recursos da cepa BL21(DE3), além de permitir a expressão ajustável de clones difíceis. A expressão sintonizável é alcançada variando o nível de lisozima, o inibidor natural da RNA polimerase T7. O nível de lisozima é modulado pela adição de L-ramnose à cultura de expressão em níveis de zero a 2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Assim, a adição opcional desse desoxiaçúcar permite a sintonia fina da expressão da proteína de interesse. Para proteínas difíceis, ajustar o nível de expressão também pode resultar em proteínas mais solúveis e dobradas adequadamente.

Dessa forma, foi feito um teste inicial com o intuito de identificar qual seria a concentração ideal de ramnose e, para isso, foram utilizadas as concentrações de 0; 0,1; 0,25/ 0,5; 0,7; 1 e 2 mmol.L^{-1} . As **figuras 37A** e **37B** mostram o resultado por meio de SDS-PAGE 15 %, onde se pode observar que a indução por 18 horas a 30°C,

com a concentração final de $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG não proporcionou uma boa expressão da proteína MIF, comparada às cepas utilizadas anteriormente sendo que as concentrações menores de ramnose levaram à expressão ligeiramente maior, sempre no extrato insolúvel.

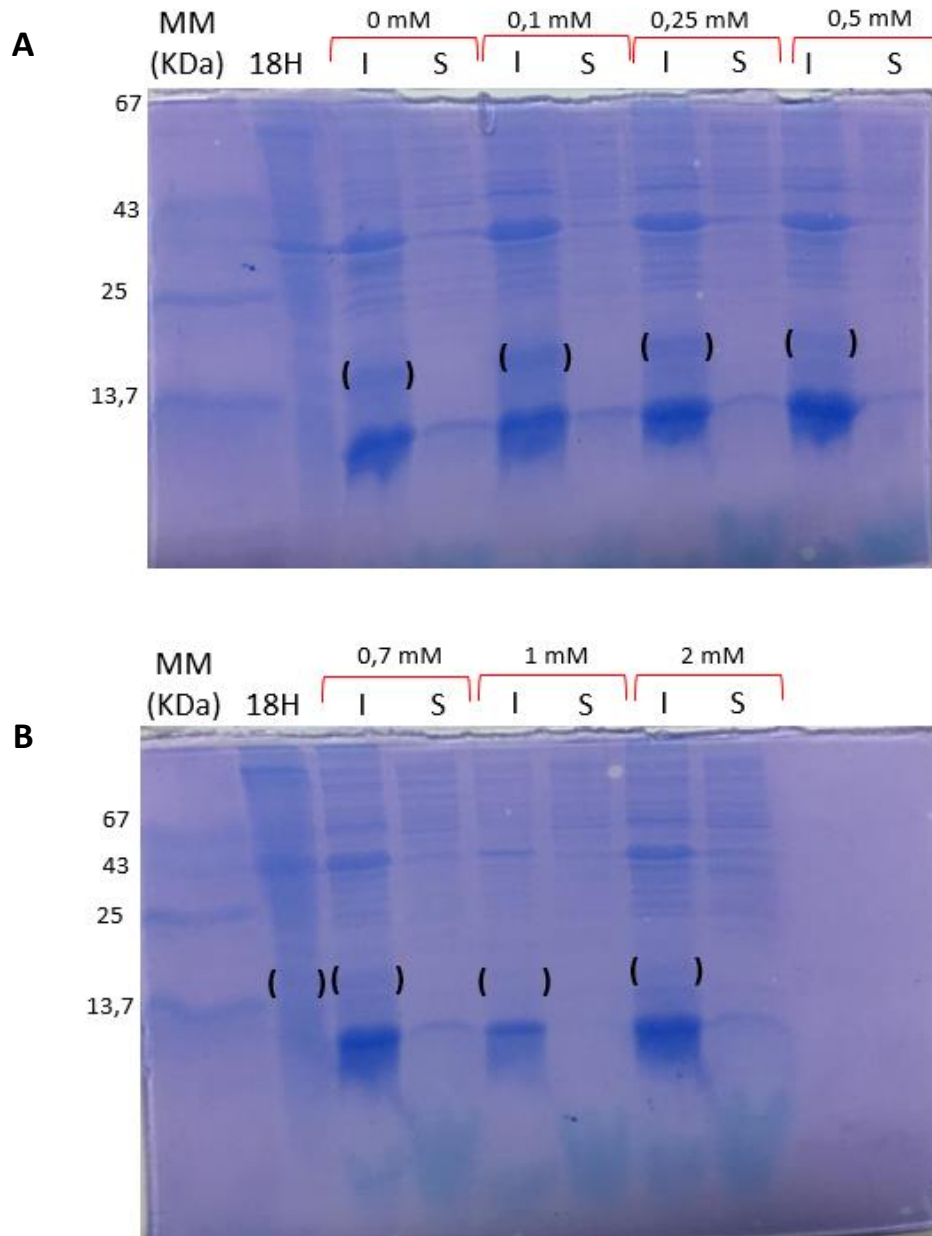


Figura 37. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 18 horas e lise de MIF em *E. coli* Lemo21(DE3). **Figura 37A** – amostras após a lise celular, com concentrações de 0/ 0,1/ 0,25 e 0,5 mmol.L^{-1} de ramnose. **Figura 37B** - amostras após a lise celular, com concentrações de 0,7/ 1 e 2 mmol.L^{-1} . MM – marcador molecular (LBBMP); 18Hs – precipitado do MIF Lemo com 18 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Lemo; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Lemo; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

5.2.6- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* Rosetta(DE3) com adição de etanol

Com o intuito de promover a expressão da proteína MIF no extrato solúvel, também foi avaliada a adição de 1,2 e 3 % (v.v⁻¹) de etanol durante a indução da expressão da cepa Rosetta(DE3). A presença do etanol pode mimetizar a resposta do choque térmico, auxiliando o enovelamento correto das proteínas expressas, além de permitir uma maior fluidez da membrana celular (CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015).

Como teste inicial, foi avaliada a indução por 4 horas a 37 °C. com três concentrações de etanol (1, 2 e 3 %).. Como observado na **figura 38**, houve expressão da proteína MIF em maior quantidade na fração insolúvel nas três concentrações de etanol avaliadas. No entanto, observando a fração solúvel da concentração de etanol 1 e 2 %, parece que há uma pequena expressão de MIF.

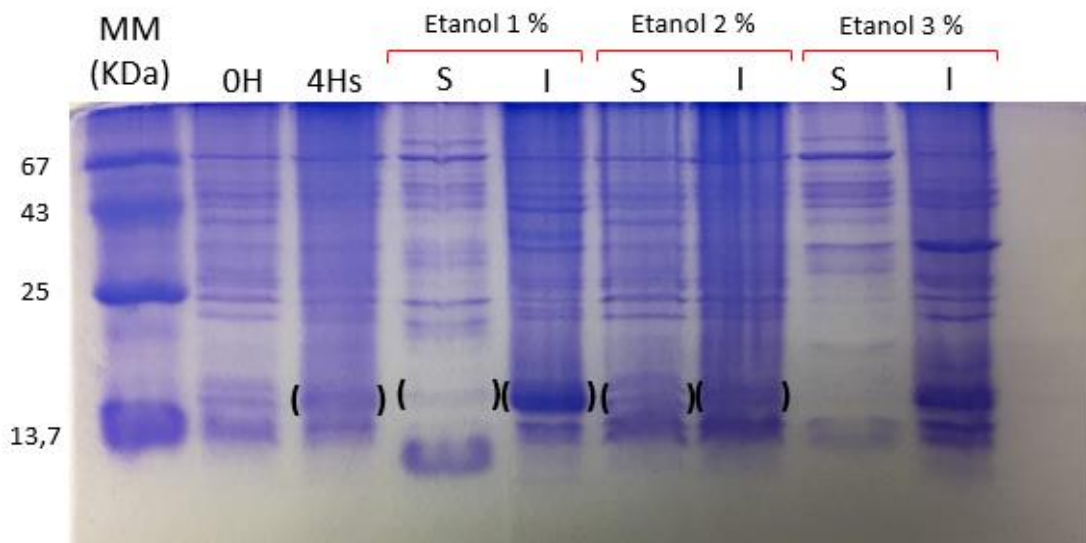


Figura 38. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 4 horas e lise de MIF em *E. coli* Rosetta(DE3). MM – marcador molecular (LBBMP); 0H – precipitado do MIF Rosetta com 0 horas de indução; 4H – precipitado do MIF Rosetta com 4 horas de indução; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; I – amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

A partir disto, como a amostra de 1 % de etanol mostrou-se mais promissora na expressão de MIF, mostrado pela **figura 38**, tanto de proteína em sua fração insolúvel como uma possível expressão no extrato solúvel, foi executado um novo

teste aumentando o tempo de indução para 24 horas com concentração de etanol 1 % no inóculo. O resultado foi analisado por meio de SDS-PAGE 15 % (**Figura 39**) mostrou que, quando expressa a 18 °C por 24 horas, a proteína mostrou expressão na fração insolúvel e uma pequena banda de expressão solúvel.

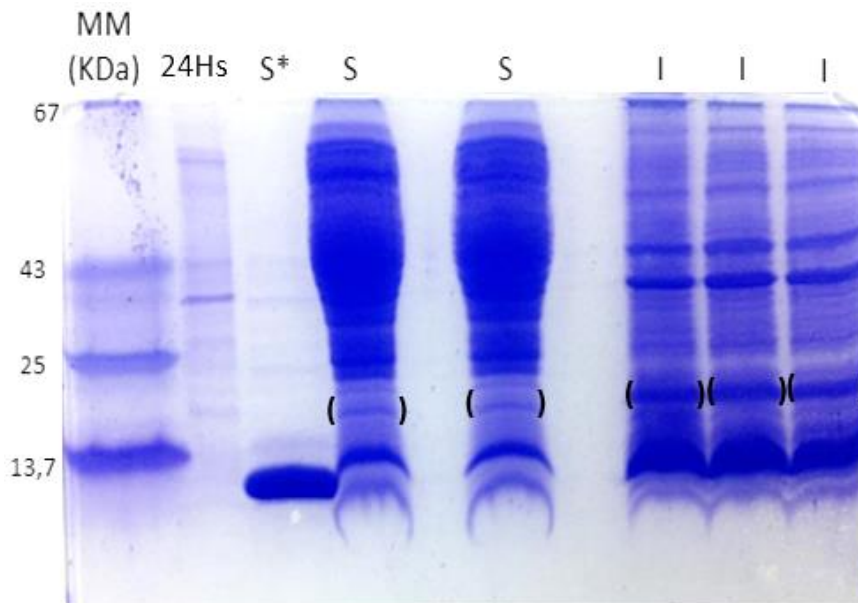


Figura 39. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 24 horas e lise de MIF em *E. coli* Rosetta(DE3) com etanol 1 %. MM – marcador molecular (LBBMP); 24H – precipitado do MIF Rosetta com 24 horas de indução diluído 3 vezes; S* - amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta diluída 3 vezes; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta diluída 3 vezes; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Com o intuito de se confirmar a produção da proteína recombinante MIF em cepas de *E. coli* Rosetta(DE3), as amostras dos testes de 24 horas de indução a 18 °C com etanol a 1 %, foram submetidas a análise por meio de *Western blot* com anticorpo Anti-His, para que se pudesse confirmar a expressão da proteína heteróloga. A **figura 40** traz o resultado da revelação da membrana de PVDF, que após o início da saturação da amostra insolúvel, ocorreu um brando aparecimento da banda na fração solúvel.

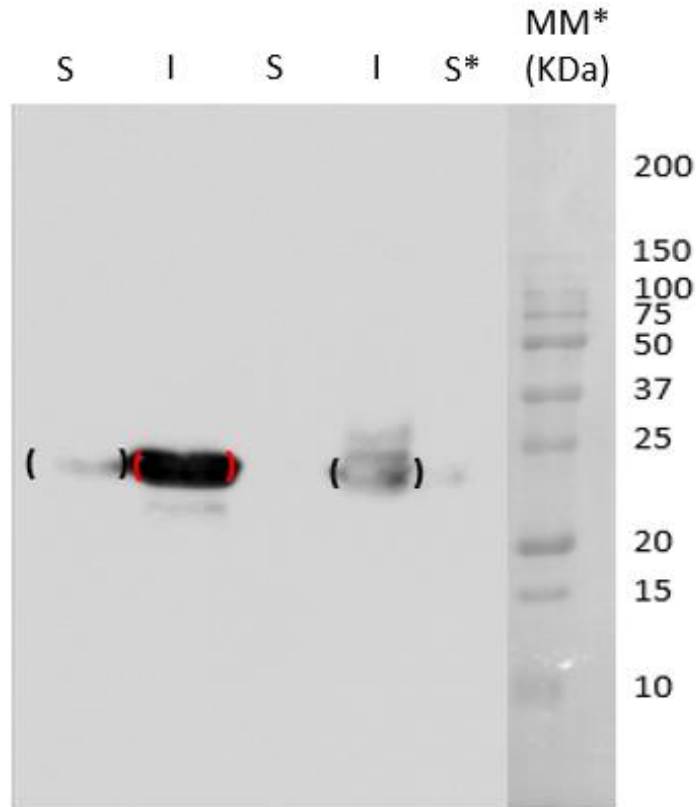


Figura 40. *Western blot* da expressão heteróloga a 24 horas de MIF em *E. coli* Rosetta(DE3) com etanol 1 %. MM* – Marcador molecular *Pierce™ “Prestained Protein MW Marker”* (ThermoFisher Scientific); S* - amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta diluída 3 vezes; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta diluída 1 veze; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

A membrana após ser revelada, foi incubada com Ponceau, na tentativa de confirmar a transferência das proteínas do gel para a membrana. De acordo com a **figura 41**, a transferência foi bem sucedida já que as bandas da proteína estão presentes, e, além disso, foi possível observar a proteína no extrato solúvel, apesar de em pouca quantidade, o que corresponde ao fraco aparecimento da banda solúvel na revelação do gel.

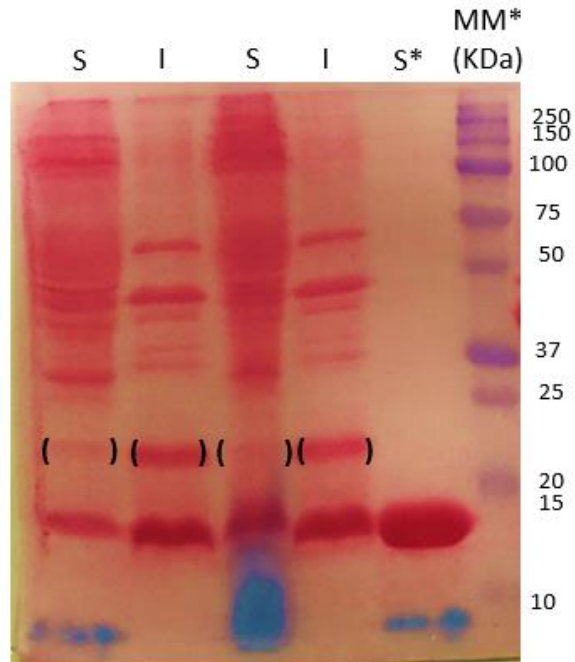


Figura 41. Imagem da membrana de PVDF, utilizada para Western blot, corada com Ponceau da expressão heteróloga a 24 horas do MIF em *E. coli* Rosetta(DE3) com etanol 1 %. MM* – Marcador molecular *Pierce*™ “*Prestained Protein MW Marker*” (ThermoFisher Scientific); S* - amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta diluída 3 vezes; S – amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta; I - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta diluída 1 vez; Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Ainda com a finalidade de aumentar a quantidade de expressão da proteína heteróloga para ensaios futuros, foram feitas cinco expressões de 2 litros com indução de IPTG a 1 mmol. L⁻¹ por 72 horas a 18 °C com etanol a 1 %. O resultado foi analisado por meio de SDS-PAGE 15 % (**Figura 42**) corado com nitrato de prata.

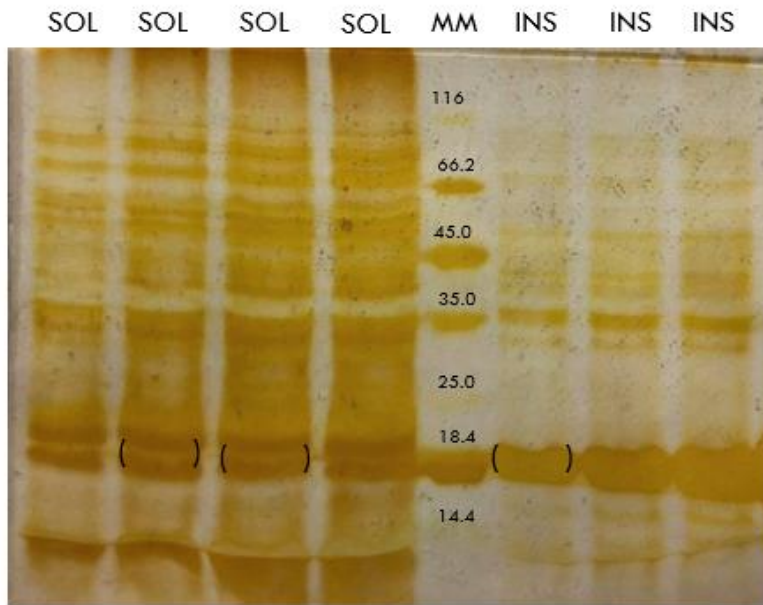


Figura 42. SDS-PAGE 15 % da expressão heteróloga por 72 horas e lise de MIF em *E. coli* Rosetta(DE3) com etanol 1 % corado com nitrato de prata. MM – Marcador molecular *Pierce™* “*Unstained Protein MW Marker*” (ThermoFisher Scientific); SOL - amostras da fração solúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta diluída em gradiente crescente 1, 2, 3 e 5 vezes (da direita para esquerda); INS - amostras da fração insolúvel da lise bacteriana do MIF Rosetta diluída em gradiente crescente 1, 2, 3 e 5 vezes (da esquerda para direita); Banda entre parênteses () – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

De acordo com a **Figura 42**, a proteína foi expressa na fração solúvel em quantidade ideal. Logo, a amostra foi submetida a cromatografia de afinidade ao cobalto, e o resultado foi analisado por meio de SDS-PAGE 15 % (**Figura 43**) corado com nitrato de prata.

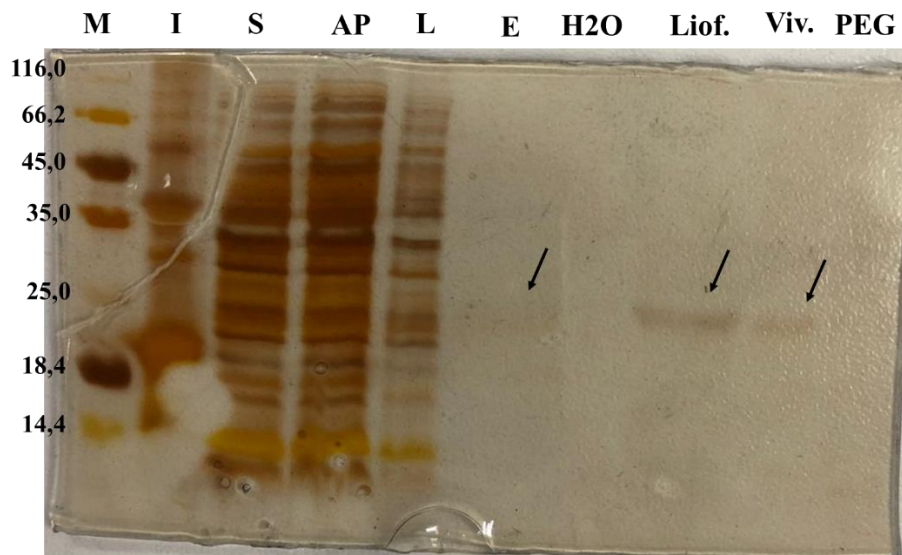


Figura 43. SDS-PAGE 15 % da purificação de MIF por cromatografia de afinidade ao cobalto corado com nitrato de prata. M – Marcador molecular *Pierce™ “Unstained Protein MW Marker”* (ThermoFisher Scientific); I – amostra da fração insolúvel da lise bacteriana de MIF Rosetta; S - amostra da fração solúvel; AP – amostra obtida durante a aplicação da amostra na coluna de purificação; L - amostra obtida durante a lavagem da coluna de purificação; E - amostra obtida durante a etapa de eluição; H₂O - amostra obtida durante lavagem final com H₂O; Liof. – amostra da eluição liofilizada; Viv. – amostra da eluição concentrada com Vivaspin; PEG – amostra da eluição concentrada com PEG. Bandas apontadas pela seta – MIF + sítio TEV + His-tag com 21,5 kDa.

Assim, após a análise do gel podemos concluir que a proteína MIF foi purificada por cromatografia de afinidade ao cobalto e que tanto a liofilização quanto o Vivaspin permitiram a concentração da proteína. No entanto, ensaios de atividade e de dicroísmo circular poderão determinar qual forma de concentração permite a manutenção da estrutura tridimensional da proteína.

Muitos esforços foram despendidos para obtenção da MIF na fração solúvel e, também, para sua purificação. A **tabela 3** mostra resumidamente todas os experimentos realizados e os resultados obtidos em cada um desses testes.

Tabela 3. Resumo dos testes de expressão realizados neste trabalho e o resultado obtido.

Cepa de <i>E. coli</i>	[IPTG] mM	Temperatura de indução (°C)	Tempo de indução (horas)	Aditivo	Expressão solúvel?
BL21	0,5	37	4	Não	Não
	0,5	18	24	Não	Não
Arctic	0,5	12	24	Não	Não
	1	12	72	Não	Não
C43	1	37	4	Não	Não
Lemo	0,4	30	18	Ramnose 0,1 a 2 mM	Não
Rosetta	0,5	37	4	Não	Não
	1	37	4	Não	Não
	1	18	24	Não	Não
	1	37	4	Etanol 1, 2 ou 3 %	Sim
	1	18	24	Etanol 1%	Sim
	1	18	72	Etanol 1%	Sim

Todos esses esforços são necessários pois, somente com uma proteína enovelada e em quantidades adequadas é que a caracterização bioquímico-estrutural pode ser realizada. E essa caracterização é passo importante para a criação de conhecimentos sólidos para, por exemplo, o desenvolvimento de novos tratamentos baseados na estrutura da MIF.

6- CONCLUSÕES

Para que seja possível realizar a caracterização da proteína MIF recombinante é necessário que a expressão se realize na fração solúvel e em grandes quantidades. Pela análise dos resultados da expressão da proteína recombinante MIF, nas diferentes cepas bacterianas utilizadas e nas diferentes condições, a única cepa que se mostrou promissora foi a cepa *E. coli* Rosetta(DE3), produzindo a proteína MIF em sua fração solúvel seguindo o protocolo de expressão com etanol 1%.

Em divergência a expressão heteróloga realizada em grande escala da proteína recombinante, aparentemente favorável para a realização dos ensaios. A proteína não foi eluída em quantidade suficiente no processo de purificação por cromatografia de afinidade com cobalto, e não respondeu de forma favorável ao ser submetida a diversas formas de concentração. Visto que é de extrema importância que a proteína esteja em sua fração solúvel, em grande quantidade e purificada para que não haja interferências nos ensaios bioquímico e cinético.

7- PERSPECTIVAS

A partir da caracterização de MIF de *Paracoccidioides* sp. objetiva-se compreender melhor a biologia desse fungo e sua interação com o hospedeiro, permitindo que seja possível o desenvolvimento de medicamentos mais específicos e com efeitos colaterais reduzidos, e, até mesmo propiciar um diagnóstico mais rápido e com especificidade para o gênero *Paracoccidioides*. Dessa forma, após a produção e purificação da proteína MIF, serão realizadas as seguintes metas:

- Realizar *Western blot* da amostra purificada para confirmar a presença de MIF.
- Caracterizar cineticamente a partir do ensaio enzimático por espectrofotometria UV/UV-Vis,
- Realizar outros ensaios bioquímico-estruturais como desnaturação térmica, Dicroísmo Circular, Espalhamento Dinâmico de Luz.

Além disso, pretende-se realizar também o ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA) com soro de pacientes infectados com a PCM, para saber se a proteína pode ser um potencial alvo de diagnóstico além de determinar a estrutura dessa proteína por meio cristalização e difração de raios-X.

8- BIBLIOGRAFIA

- AUGUSTIJN, K. D. et al. Functional characterization of the Plasmodium falciparum and P. berghei homologues of macrophage migration inhibitory factor. **Infection and Immunity**, 2007.
- BAGAGLI, E. et al. **Paracoccidioides brasiliensis: Phylogenetic and ecological aspects** *Mycopathologia*, 2008.
- BERNHAGEN, J. et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. **Nature**, 1993.
- BERNHAGEN, J. et al. **Erratum: MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia (Nature (1995) 365 (756-759))** *Nature*, 1995.
- BESSETTE, P. H. et al. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1999.
- BLOOM, B. R.; BENNETT, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. **Science**, 1966.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **ELECTROPHORESIS**, 1987.
- BOTTEON, F. A. G. et al. Paracoccidioides brasiliensis-reactive antibodies in Brazilian blood donors. **Medical mycology**, v. 40, p. 387–391, 2002.
- CALANDRA, T. et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. **Nature**, 1995.
- CALANDRA, T.; ROGER, T. **Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity** *Nature Reviews Immunology*, 2003.
- CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. **Paracoccidioides Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies** *Mediators of Inflammation*, 2017.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J. et al. **Antifungal agents: Mode of action in yeast cells** *Revista Espanola de Quimioterapia*, 2006.
- CHAUHAN, N.; SHARMA, R.; HOTI, S. L. Acta Tropica Identification and biochemical characterization of macrophage migration inhibitory factor-2 (MIF-2) homologue of human lymphatic filarial parasite , Wuchereria bancrofti. **Acta Tropica**, v. 142, p. 71–78, 2015.

- CHHETRI, G.; KALITA, P.; TRIPATHI, T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. **MethodsX**, v. 2, p. 385–391, 2015.
- COITINHO, J. B. et al. Expression, purification and preliminary crystallographic studies of NahF, a salicylaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* G7 involved in naphthalene degradation. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 68, n. 1, p. 93–97, 2012.
- COUTINHO, Z. F., SILVA, D. ET AL. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, 2002.
- DAVID, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1966.
- DE OLIVEIRA, H. C. et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–14, 2015.
- DESJARDINS, C. A. et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLoS genetics**, v. 7, n. 10, p. e1002345, out. 2011.
- DÍEZ, S. et al. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, p. 1536–1542, 2003.
- FERNANDES, V. C. et al. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 367, p. 78–84, 2011a.
- FERNANDES, V. C. et al. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 1062–1072, 2011b.
- FERRER, M. et al. Functional consequences of single:double ring transitions in chaperonins: Life in the cold. **Molecular Microbiology**, 2004.
- FINGERLE-ROWSON, G. et al. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. **American Journal of Pathology**, 2003.
- FLASTER, H. et al. The MIF-Glucocorticoid Dyad: Regulation of Inflammation and Immunity. **Molecular Endocrinology**, 2007.
- GARCIA BLANCO, S. et al. Differential PbP27 expression in the yeast and mycelial forms of the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p.

1087–1095, 2011.

GOLDANI, L. Z.; SUGAR, A. M. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1998.

GOMES, G. M. et al. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 2000.

GROCOTT, R. G. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. **American journal of clinical pathology**, v. 25, n. 8, p. 975–979, 1955.

HUDSON, J. D. et al. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. **Journal of Experimental Medicine**, 1999.

KLEEMANN, R. et al. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. **Journal of Molecular Biology**, 1998.

LACAZ, C. S. et al. Tratado de Micologia médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2002.

LEBENDIKER, M.; DANIELI, T. **Production of prone-to-aggregate proteins** **FEBS Letters**, 2014.

LENG, L.; BUCALA, R. **Insight into the biology of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor**. Cell Research. **Anais...**2006

LENHARD-VIDAL, A et al. *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* antigens elicit different serum IgG responses in chronic paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5–6, p. 345–52, dez. 2013.

MARQUES, S. A.; LEITE, R. C.; PAULO, S. Paracoccidioidomycosis. p. 610–615, 2012.

MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2015.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. p. 1–13, 2017.

MENDES PEÇANHA, P. **Aspectos epidemiológicos e Clínicos da Paracoccidioidomycose no estado do Espírito Santo**. [s.l: s.n.].

MENDES, R. P. et al. **Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil**. [s.l: s.n.]. v. 11

- MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, 2017b.
- MISKA, K. B. et al. Characterisation of macrophage migration inhibitory factor from *Eimeria* species infectious to chickens &. v. 151, p. 173–183, 2007.
- MITCHELL, R. A. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: Regulatory role in the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2002.
- MIZUE, Y. et al. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2005.
- MORETO, T. C. et al. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2011.
- OLIVEIRA, H. C. DE et al. Paracoccidioides -host Interaction : An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. v. 6, n. November, p. 1–20, 2015.
- PEÇANHA, P. M. **Aspectos epidemiológicos e clínicos da Paracoccidioidomicose no Estado do Espírito Santo**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.
- PETROVSKY, N. et al. Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. **Immunology and Cell Biology**, 2003.
- POWELL, N. D. et al. Cutting Edge: Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Necessary for Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, 2005.
- PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and immunity**, v. 53, p. 199–206, 1986.
- QUEIROZ-TELLES, F. et al. **Neglected endemic mycoses** **The Lancet Infectious Diseases**, 2017.
- RITA, M.; FORTES, P.; MIOT, H. A. Imunologia da paracoccidioidomicose *Immunology of paracoccidioidomycosis*. p. 516–524, 2011.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges** **Frontiers in Microbiology**, 2014a.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in microbial systems. v. 5, n. July, p. 1–2, 2014b.

ROSENGREN, E. et al. The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. **FEBS Letters**, 1997.

SAN-BLAS, G., NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: RL, C. R. C. (Ed.). . **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**. New York: Marcel Dekker, 2001.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. **Mycopathologia**, 1977.

SENDER, P. D. et al. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase and biological activities by acetaminophen metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2002.

SHAO, D. et al. Detection of Plasmodium falciparum derived macrophage migration inhibitory factor homologue in the sera of malaria patients. v. 106, p. 9–15, 2008.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis Treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. suppl 19, p. 31–37, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. **Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, , 1 set. 2017.

SLABINSKI, L. et al. XtalPred: A web server for prediction of protein crystallizability. **Bioinformatics**, v. 23, n. 24, p. 3403–3405, 2007.

SOMMERVILLE, C. et al. Biochemical and immunological characterization of *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 18, p. 12733–41, 2013.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K. Drug resistance Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 65–71, 2014a.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K. **Overcoming antifungal resistance** *Drug Discovery Today: Technologies*, 2014b.

SUN, H. W. et al. The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: Evidence for a trimer. **Protein Engineering**, 1996a.

SUN, H. W. et al. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1996b.

TABORDA, C. P. et al. PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS: CHALLENGES IN THE DEVELOPMENT OF A VACCINE AGAINST AN ENDEMIC MYCOSIS IN THE AMERICAS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 2015.

TAVARES, A. H. et al. Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. **Fungal Genetics and Biology**, 2015a.

TAVARES, A. H. et al. Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. **Fungal Genetics and Biology**, v. 81, p. 98–109, 2015b.

THIELE, M.; BERNHAGEN, J. **Link between macrophage migration inhibitory factor and cellular redox regulation** *Antioxidants and Redox Signaling*, 2005.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, n. April, p. 9–25, 2017.

VERMEIRE, J. J. et al. Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. n. July, p. 355–363, 2008.

VIDAL, M. S. M. et al. Atypical Serological Response Marked by a Lack of Detectable Anti-gp43 Antibodies in a Patient with Disseminated *Paracoccidioidomycosis* Atypical Serological Response Marked by a Lack of Detectable Anti-gp43 Antibodies in a Patient with Disseminated Paraco. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 3014–3016, 2005.

WANKE, B.; AIDÉ, M. A. Chapter 6 - *paracoccidioidomycosis*. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1245–1249, 2009.

APÊNDICE

Publicações e apresentações de trabalho no período do mestrado (2018 – 2020)

Artigo científico:

AMORIM, VANESSA G. ; MELO, SHAIANI M.G. ; LEITE, RUAN F. ; **COUTINHO, PAULO ARTHUR**; DA SILVA, SARAH M.P. ; SILVA, ANDRÉ R. ; AMORIM, FERNANDA G. ; PIRES, RITA G.W. ; COITINHO, JULIANA B. ; EMERY, FLAVIO S. ; REZENDE, LUCAS C.D. . Synthesis and characterization of two novel red-shifted isothiocyanate BODIPYs and their application in protein conjugation. *DYES AND PIGMENTS*, v. 182, p. 108646, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108646>

Resumos publicados em anais de congressos como primeiro autor/ apresentação de poster:

COUTINHO, P. A. ; MARTINS, M. M. ; SANTOS, A. M. C. ; Coitinho, Juliana B. . Caracterização bioquímica da proteína MIF (fator inibidor da migração de macrófagos), um potencial fator de virulência em *Paracoccidioides*. In: XI Encontro Nacional de Comissões Internas de Biossegurança e 8º Encontro Bienal de Biossegurança, 2018, Vitória. Anais do ENCIBio/EBBio2018, 2018. p. 43-43.

COUTINHO, P. A. ; MARTINS, M. M. ; SANTOS, A. M. C. ; Coitinho, Juliana B. . Expressão do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) recombinante, um potencial alvo para drogas contra *Paracoccidioidomicose*. In: VIII Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia (VIII ENAPEBI), 2018, Belo Horizonte. VIII Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia (VIII ENAPEBI), 2018.

Resumos publicados em anais de congressos como co-autor:

FONSECA, J. Z. ; **COUTINHO, P. A.** ; MARTINS, M. M. ; COITINHO, J. B. Alternativas mais econômicas para cultivo de cepas de *Escherichia coli* e expressão de proteínas recombinantes. In: Jornada de Iniciação Científica da UFES - 2019/2020, 2020, Virtual. Anais da Jornada de Iniciação Científica da UFES. Vitória: PRPPG - Ufes, 2020. v. 11.

MARTINS, M. M.; **COUTINHO, P. A.** ; SANTOS, A. M. C. ; COITINHO, J. B. . Expression of catechol-o-methyl transferase (COMT) from *Paracoccidioides* spp. for biochemical and structural characterization. In: 30th Annual Users Meeting - RAU - CNPEM, 2020, Virtual. 30th Annual Users Meeting Abstract Book, 2020. p. 74.

VITORIA, I. M. ; MARTINS, M. M. ; **COUTINHO, P. A.** ; COITINHO, J. B. . Expressão da proteína dihidrofolato redutase (DHFR) em *Escherichia coli*. In: Jornada de

Iniciação Científica da UFES, 2019, Vitória. Anais da Jornada de Iniciação Científica da UFES, 2019. v. 10.

AMORIM, V. G. ; MELO, S. M. G. ; LEITE, R. F. ; **COUTINHO, P. A.** ; SILVA, A. R. ; AMORIM, F. G. ; COITINHO, J. B. ; EMERY, F. S. ; REZENDE, L. C. D. . Caracterização de dois novos fluoróforos derivados do BODIPY e sua aplicação em bioconjugação. In: VII Encontro Capixaba de Química (VII Encaqui), 2019, Vitória. VII Encontro Capixaba de Química (VII Encaqui), 2019.

MARTINS, M. M. ; **COUTINHO, P. A.** ; SANTOS, A. M. C. ; Coitinho, J.B. Expressão da proteína dihidrofolato redutase (DHFR) em Escherichia coli.. In: XI Encontro Nacional de Comissões Internas de Biossegurança e 8º Encontro Bienal de Biossegurança, 2018, Vitória. Anais do ENCIBio/EBBio 2018. Vitória, 2018. p. 53-53.

MARTINS, M. M. ; **COUTINHO, P. A.** ; SANTOS, A. M. C. ; Coitinho, J.B. Expressão da proteína dihidrofolato redutase (DHFR) em Escherichia coli.. In: VIII Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia (VIII ENAPEBI), 2018, Belo Horizonte. VIII Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia (VIII ENAPEBI), 2018.

MARTINS, G. H. ; MARTINS, M. M. ; **COUTINHO, P. A.** ; SANTOS, A. M. C. ; Coitinho, J.B. Expressão e purificação da enzima recombinante catecol-O-metil-transferase (COMT) de Paracoccidioides.. In: Jornada Universitária Capixaba de Odontologia (JUNCO), 2018, Vitória. Jornada Universitária Capixaba de Odontologia (JUNCO), 2018.

MARTINS, G. H. ; MARTINS, M. M. ; **COUTINHO, P. A.** ; SANTOS, A. M. C. ; Coitinho, J.B. Expressão e purificação da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) de Paracoccidioides. In: 42ª Jornada Universitária Capixaba de Odontologia, 2018, Vitória. Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde. Vitória: Ufes, 2018. v. 20. p. 9-9.