

KRUG, MS<sup>1\*</sup>; SILVEIRA, CP<sup>2,3</sup>; LANDELL, MF<sup>3</sup>; SCHRANK, A<sup>2,3,4</sup>; VAINSTEIN, MH<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Graduação em Biotecnologia

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

<sup>3</sup>Laboratório de Fungos de Importância Médica – Centro de Biotecnologia

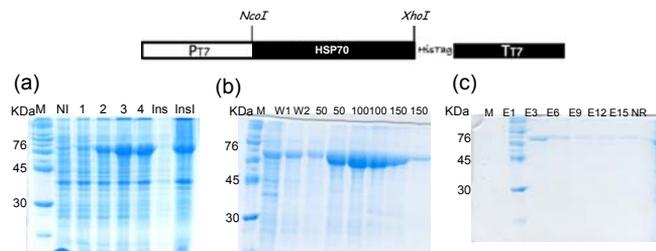
<sup>4</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

\*e-mail: [moniquesk@terra.com.br](mailto:moniquesk@terra.com.br)

## INTRODUÇÃO

Pandemias como a do HIV, e imunoterapias, entre outros fatores imunossupressores, propiciam que patógenos oportunistas infectem e muitas vezes levem pacientes imunocomprometidos a óbito. Nos últimos 20 anos, houve um aumento na taxa de mortalidade e morbidade causada por micoses invasivas. O tratamento para essas infecções é difícil principalmente, devido à eficiência das drogas existentes, ao alto custo dos tratamentos, aos efeitos colaterais, ao tempo de terapia e ao surgimento de resistência fúngica. Nesse sentido, faz-se necessário a busca de alternativas contra essas doenças, como por exemplo, o uso de peptídeos antifúngicos (ubíquos em plantas e animais) que podem ter alvos específicos ou ser multifuncionais no seu mecanismo de ação. Estudos demonstram que a inibição de uma proteína HSP90 de *Candida albicans* por um anticorpo monoclonal, diminui a resistência contra agentes antifúngicos e aumenta a atividade antifúngica. Este anticorpo apresenta atividade contra espécies de *Candida* quando usado sozinho ou combinado com fluconazol, caspofungina e anfotericina B (Wargo *et al.*, 2009). O objetivo do trabalho foi expressar, purificar e avaliar a atividade antifúngica da proteína recombinante HSP70, de *Cryptococcus neoformans var. grubii* e o sinergismo desta, com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra espécies patogênicas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

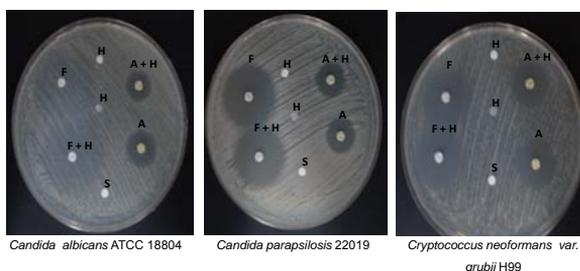


**Figura 1:** (a) Expressão da proteína HSP70 recombinante (M= marcador de peso molecular; NI= não induzido; 1, 2,3,4,= 1,2,3,4 horas de indução; Ins= fração insolúvel. (b) e (c) Purificação de HSP70 em coluna de afinidade por níquel.

A proteína recombinante HSP70 de *C. neoformans var. grubii* não apresentou atividade antifúngica quando testada isoladamente contra as leveduras testadas (Tabela 1). Por outro lado, quando HSP70 foi testada em conjunto com Anfotericina B houve uma diminuição no diâmetro para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*. Quando HSP70 foi testada em conjunto com Fluconazol houve uma diminuição no diâmetro para *C. parapsilosis*. Entretanto, para *C. neoformans* houve um aumento no diâmetro quando em conjunto com o antifúngico (Figura 2).

## MATERIAL E MÉTODOS

A sequência nucleotídica do cDNA correspondente ao gene que codifica a proteína HSP70 em *C. neoformans* linhagem H99 foi obtida junto ao banco de dados do BROAD Institute ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html)). O cDNA foi amplificado e subclonado em pUC18. Posteriormente, o mesmo foi subclonado nos sítios de NcoI e XhoI no plasmídeo pET23d (pET23dHSP70). Os clones positivos foram submetidos a sequenciamento e pET23dHSP70 foi transformando em *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. A proteína recombinante foi purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A atividade antifúngica da proteína e sua ação sinérgica com Anfotericina B e Fluconazol foram testadas contra *C. albicans* ATCC18804, *Candida parapsilosis* ATCC22019 e *C. neoformans var. grubii* H99 através da técnica de difusão em ágar, segundo o protocolo M2-A8 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).



**Figura 2:** Teste de difusão em ágar. S= controle negativo (solução salina 0,9%); H= proteína HSP70 recombinante (10µg/disco); A= Anfotericina B (100µg/disco); A+H= Anfotericina B (100µg/disco) e HSP70 (10µg/disco); F= Fluconazol (25µg/disco); F+H= Fluconazol (25µg/disco) e HSP70 (10µg/disco). As leveduras foram semeadas a partir de uma suspensão de células de OD530= 0,12 a 0,15.

**Tabela 1:** Resultado do teste de difusão em ágar.

Microrganismos	Diâmetro de inibição (mm)					
	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	
	I	II	I	II	I	II
Salina	0	0	0	0	0	0
HSP70	0	0	0	0	0	0
Anfo+HSP70	17 ± 1 <sup>a</sup>	13,5 ± 0,71 <sup>(b)</sup>	22 ± 1	20 ± 1,5	25,7 ± 1,2	25 ± 2,83
Anfo	21,3 ± 1,53	17 ± 1,41	23 ± 1	22 ± 0,9	27 ± 1	25,5 ± 4,95
Fluco + HSP70	0	0	39 ± 1,7	38 ± 1,9	26 ± 1 <sup>(c)</sup>	38,5 ± 3,53
Fluco	0	0	39,7 ± 1,5	39,5 ± 1,1	28 ± 2	29 ± 14,14

Anfo: Anfotericina B (100 µg/disco); Fluco: Fluconazol (25 µg/disco); HSP70 (10 µg/disco)

I - Experimento 1; II - Experimento 2

a - Significativamente diferentes com P < 0,05, segundo Student's t

(b),(c) - Significativamente diferentes com P < 0,05 entre I e II, segundo Student's t

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da clonagem do gene *hsp70* de *C. neoformans var. grubii*, codificando a proteína HSP70, no vetor de expressão pET23d (pET23dHSP70) foi feita a expressão heteróloga da proteína recombinante em *E. coli* linhagem BL21(DE3)pLysS e purificação em coluna de afinidade carregada com níquel com um grau de pureza satisfatório (Figura 1).

## REFERÊNCIAS

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição M2-A8, 8ª ed., 2003.
- Wargo KA and Karwa R. Efungumab: a novel agent in the treatment of invasive candidiasis. Ann Pharmacother. 2009 Nov;43(11):1818-23. Epub 2009 Sep 22.

## CONCLUSÕES

A expressão e purificação da proteína recombinante foi obtida com sucesso.

Apesar de alguns estudos já terem demonstrado peptídeos com atividade antifúngica, a proteína HSP70 recombinante não apresentou ação sinérgica com os antifúngicos testados.