

Expressão, purificação e avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de HSP70 recombinante e o efeito sinérgico frente à anfotericina B e fluconazol

Krug, MS¹; Silveira, CP¹; Landell, MF¹; Schrank, A¹; Vainstein, MH¹

¹Laboratório de Fungos de Importância Médica – Centro de Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

moniquesk@terra.com.br

Palavras-chave: HSP70, anfotericina B, fluconazol, atividade antifúngica.

Pandemias como a do HIV e imunoterapia, entre outros fatores imunossupressores, propiciam que patógenos oportunistas infectem e muitas vezes levem pacientes imunocomprometidos a óbito. O tratamento para essas infecções é difícil, principalmente, devido à aos efeitos colaterais, ao tempo de terapia. Nesse sentido, faz-se necessário a busca de alternativas contra essas doenças. Estudos demonstram que o uso de um anticorpo monoclonal contra HSP90 de *Candida albicans*, diminui a resistência contra agentes antifúngicos e aumenta a atividade antifúngica. Baseado nisso, 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*. A sequência da HSP70 foi isolada a partir do cDNA e subclonada em pUC18 e posteriormente clonada nos sítios de *NcoI* e *XhoI* no vetor pET23d (pET23dHSP70). Os clones positivos foram submetidos ao seqüenciamento e pET23dHSP70 foi transformando em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. A proteína recombinante foi purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. O efeito antifúngico da proteína e sua ação sinérgica com anfotericina B e fluconazol serão testados contra *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* e *C. gatti* segundo Lin *et al.* (2010). Os resultados da clivagem por enzima de restrição demonstraram que a sequência de cDNA foi inserida no vetor com sucesso entre os sítios *XhoI* e *NcoI*. A presença de uma cauda de poli-histidina na porção N-terminal da proteína recombinante possibilitou uma fácil purificação e detecção. A proteína HSP70r, analisada por gel SDS-Page, apresentou uma massa molecular de aproximadamente 76 kDa. Perspectivas: com base nesses resultados, pretende-se testar a atividade antifúngica dessa proteína frente aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol, ambos utilizados no tratamento de criptococose e candidíase.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FINEP, Ludwig Biotec