

## INTRODUÇÃO

*Cryptococcus neoformans* é um fungo leveduriforme encapsulado que acomete pacientes imunocomprometidos, como portadores de vírus HIV ou pacientes recém-transplantados. A infecção inicia-se no pulmão podendo chegar ao sistema nervoso central, gerando um quadro de meningoencefalite. O tratamento atualmente empregado faz uso de fungicidas como anfotericina B e fluconazol, porém ele é muito longo e apresenta muitos efeitos colaterais, o que leva a muitos pacientes interromperem o tratamento antes de seu término.

## OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho é testar uma vacina terapêutica de DNA contendo a sequência de HSP70 de *C. neoformans* e avaliar os efeitos deste tratamento no avanço da criptococose em camundongos.

## MATERIAS E MÉTODOS

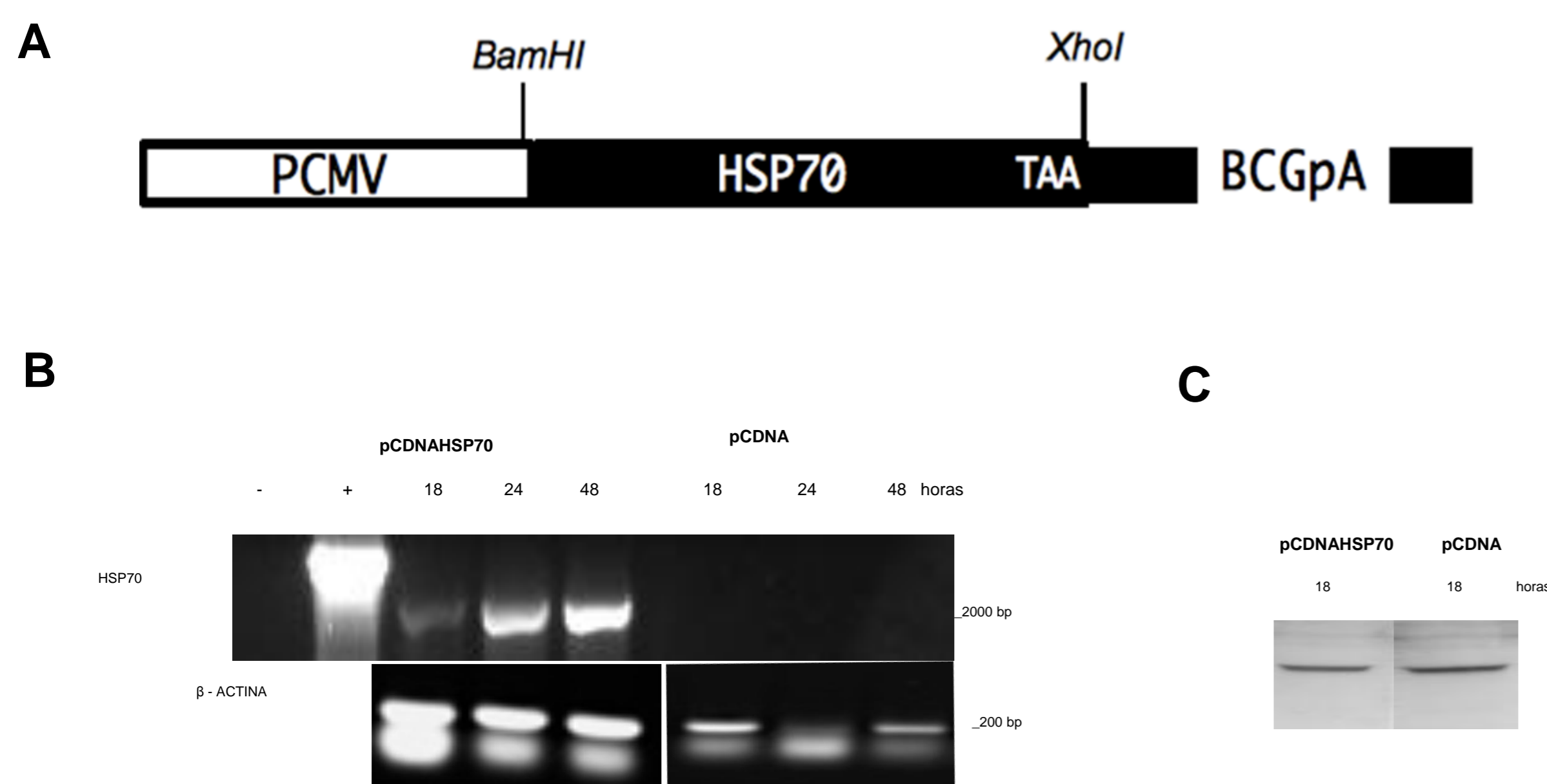
**Construção do plasmídeo utilizado para a vacina de DNA contra criptococose.** A sequência de cDNA do gene da HSP70 de *C. neoformans* H99 foi clonada no plasmídeo pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) entre os sítios de clivagem *Bam*HI e *Xho*I. *Escherichia coli* XL1-BLUE foi transformada com o novo plasmídeo denominado pcDNAHSP70. Como controle utilizou-se o vetor pcDNA vazio. A extração do plasmídeo foi realizada com um kit de maxiprep livre de endotoxina (Sigma). A concentração de plasmídeo foi determinada pelo Qubit (Invitrogen). A expressão plasmidial foi testada em células da linhagem A549 transfetadas utilizando lipofectamina (Lipofectamine LTX and Plus reagents – Invitrogen). Após 48 horas, o RNA e proteína total das células foram extraídos utilizando o reagente Trizol.

**Infecção e tratamento dos camundongos.** Trinta camundongos BALB/c fêmeas foram infectados por via intranasal com *C. neoformans* linhagem H99 e após separados em 3 grupos: grupo controle: sem tratamento; grupo pcDNA: tratado com o vetor plasmidial vazio; grupo pcDNAHSP70: tratado com o plasmídeo pcDNAHSP70. As aplicações foram realizadas de dois em dois dias, via intramuscular, perfazendo um total de três aplicações. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (nº 19119).

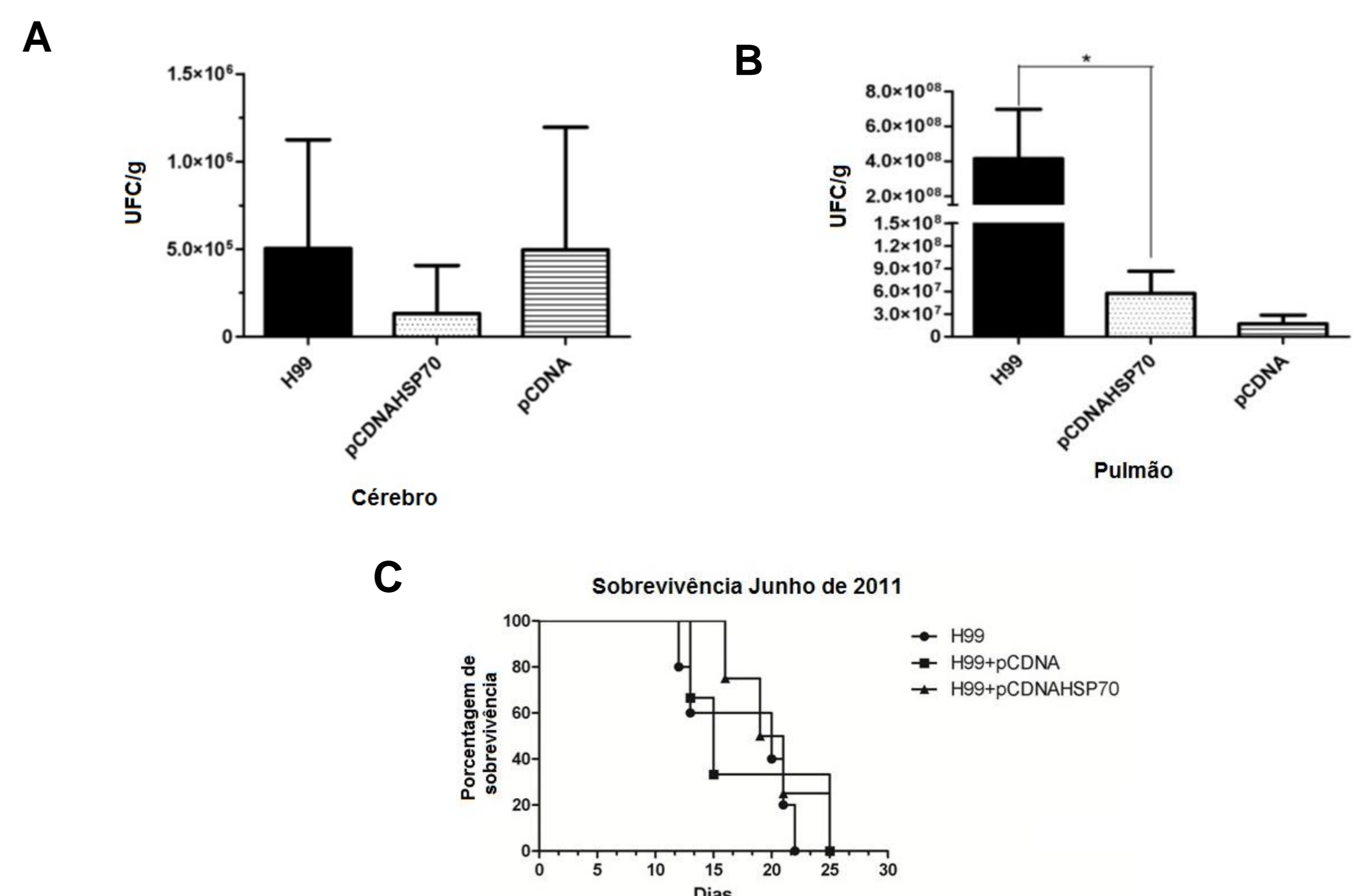
**Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).** Após 15 dias da infecção, os camundongos foram sacrificados, pulmão e cérebro foram retirados para realizar a contagem de UFC e o baço foi retirado para realizar a análise padrão de citocinas. O cérebro e os pulmões foram macerados com PBS e plaqueados em YPD (2% de glicose, 2% de peptona, 1% extrato de levedura, 1,5% de Agar) para contagem de UFC. As placas foram incubadas a 37° C por 2 dias.

**Curva de sobrevivência** Os camundongos BALB/c fêmeas foram infectados por via intranasal com *C. neoformans* linhagem H99 e separados em 3 grupos: grupo controle: sem tratamento; grupo pcDNA: tratado com o vetor plasmidial vazio; grupo pcDNAHSP70: tratado com o plasmídeo contendo a sequência de HSP70. Após 5 dias de infecção iniciou-se a o tratamento por via intramuscular. As aplicações foram realizadas de dois em dois dias, perfazendo um total de 3 aplicações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Figura 1: Representação esquemática do plasmídeo pcDNAHSP70 e ensaio de viabilidade em células A549.** (A) Esquema da construção do plasmídeo de pcDNAHSP70. (B) Expressão do mRNA das células A549 transfetadas com o plasmídeo pcDNAHSP70 e pcDNA nos tempos de 18, 24 e 48 horas. O plasmídeo pcDNAHSP70 gerou um fragmento de 2000 pb correspondente ao transcrito do gene *hsp70*. Como controle interno utilizou-se o gene da β-actina. (C) Expressão da proteína HSP70 das células A549 transfetadas com o plasmídeo pcDNAHSP70 e pcDNA em 48 horas. Tanto as células transfetadas com pcDNAHSP70 e pcDNA (vetor vazio) apresentaram um fragmento de 70 kDa correspondente à proteína HSP70. O anticorpo utilizado no experimento foi gerado a partir da imunização de camundongos com uma HSP70 recombinante de *C. neoformans* H99. Esse resultado poderia ser explicado uma vez que a proteína HSP70 é altamente conservada entre os organismos.



**Figura 2: Infecção experimental utilizando a vacina de DNA.** (A) Contagem de unidades formadoras de colônias no cérebro. (B) Contagem de unidades formadoras de colônias nos pulmões. Como observado, houve diminuição no número de colônias no cérebro do grupo tratado com pcDNAHSP70 e nos pulmões dos grupos de camundongos tratados com pcDNAHSP70 e pcDNA. (C) Ensaio de sobrevivência dos camundongos tratados e infectados. Não houve diferença significativa na taxa de sobrevivência entre os diferentes grupos. Isso poderia ser explicado pelo tempo de infecção, uma vez que o experimento de UFC durou 14 dias e o de sobrevivência 25 dias. Durante este tempo, a vacina de DNA poderia estar retardando o desenvolvimento e proliferação do fungo. No dia 14, o tratamento foi interrompido e o fungo pode ter proliferado igualmente nos grupos testados. Outra explicação para estes resultados é que a análise de UFC calcula a média e o ensaio de sobrevivência avalia cada indivíduo do grupo.

## APOIO

## PERSPECTIVAS