ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPOSSOMAS ASSOCIADOS À PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS DERIVADOS DA HISTATINA-5 VISANDO O COMBATE DE CANDIDA ALBICANS

Jéssica Ellen de Oliveira[a,*], Carolina Reis Zambom[b], Saulo Santesso Garrido[b]

[a] *Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil;*
[b] *Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Araraquara, SP, Brasil*

Introdução: A Candida albicans é um fungo dimórfico de maior prevalência na cavidade oral e a principal espécie causadora de candidíase. Em parte, as ações patogênicas de Candida albicans devem-se a formação dos biofilmes, uma matriz polimérica extracelular e responsável pela virulência deste microrganismo. Na cavidade oral essa matriz pode ser inibida por meio de peptídeos antimicrobianos, como histatina-5, que agem nas células planctônicas de Candida albicans e impedem a formação dos biofilmes. No entanto, a histatina-5 possui rápida degradação enzimática o que diminui o seu potencial de ação nos biofilmes já formados. Neste contexto, o objetivo do estudo foi associar histatina-5 a lipossomas PEGuilados para inibir a virulência formada por biofilmes de Candida albicans e proteger o peptídeo de ações enzimáticas.

Métodos: Para síntese de peptídeo foi aplicado o método de síntese em fase sólida e realizada a purificação por cromatografia de alta eficiência. Com o peptídeo purificado foi realizada associação do peptídeo ao lipossoma PEGuilado por método de evaporação em fase reversa sendo quantificado o peptídeo ao lipossoma por ultracentrifugação seguida da análise em espectrofluorímetro. Os ensaios microbiológicos do peptídeo 0Whistatina-5 foram realizados através da concentração inibitória mínima e a associação do lipossoma PEGuilado observada por meio da viabilidade celular por resazurina (AlamarBlue®).

Resultados e discussão: O método de síntese de peptídeo em fase sólida apresentou rendimento bruto satisfatório (74 %). O grau de pureza do peptídeo foi superior a 90 %, sendo ideal para confiabilidade da atividade do peptídeo. A adição de triptofano a histatina-5 permitiu a análise da associação ao lipossoma PEGuilado o qual gerou 88,65 % de eficiência, dado fundamental para a atividade do peptídeo. Para os ensaios microbiológicas foi observado que 80 μmol/L do peptídeo gerou 8,98 % de inibição. Ao associar 100 μmol/L do peptídeo no lipossoma PEGuilado foi analisado que a viabilidade celular manteve-se a 65 %, enquanto o peptídeo na mesma concentração não associado manteve a viabilidade celular em 70 % resultado indicativo de estabilidade na atividade do peptídeo.

Conclusão: A associação do peptídeo 0Whistatina-5 ao lipossoma PEGuilado permitiu a atividade fungistática do peptídeo, porém novos estudos devem ser realizados para o desenvolvimento antibiofilme do derivado de histatina-5.

Palavras-chave: Lipossomas PEGuilados Biofilme Peptídeo Antimicrobiano

https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.102844

GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO RELATIVA POR QPCR EM ISOLADOS DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Michelly Maria Pereira e Oliveira[a,*], Ana Paula Domingues de Lima[a], Paula Mariana Salgueiro de Souza[a], Márcia Maria Camargo de Morais[a], Anna Carolina Soares Almeida[b]

[a] *Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brasil;*
[b] *Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil*

Introdução/Objetivo: Isolados de Klebsiella pneumoniae resistentes à multiplas drogas têm sido extensivamente reportados em todo o mundo. Alguns determinantes de resistência tornaram-se mais preocupantes pela sua disseminação, como o gene blakpc, já reportado em cepas com altos níveis de resistência aos carbapenêmicos. Em determinados contextos, esse fenômeno é atribuído a mecanismos adicionais, como por exemplo, a regulação da expressão desse gene. Esse trabalho avaliou a estabilidade da expressão de genes candidatos a controles endógenos em K. pneumoniae para aplicação em estudos de expressão relativa por qPCR.

Métodos: Foram pré-selecionados vinte e um pares de iniciadores candidatos a controles endógenos, submetidos a análises in sílico, avaliando-se: amplificação nos principais grupos clonais de K. pneumoniae; tamanho do fragmento; temperatura de melting e formação de estruturas secundárias. Os primers foram validados pelo método de curva padrão. O RNA foi extraído usando TRIzol® e o cDNA, sintetizado com o Kit EasyScript™. As reações de qPCR foram realizadas no equipamento StepOneTM, com o fluoróforo SYBR® Green. Foram utilizados isolados clínicos com distintos perfis de susceptibilidade aos carbapenêmicos para testar a estabilidade dos genes frente a exposição com antimicrobiano. Os dados foram analisados no software BestKeeper.

Resultados: Os primers para os genes proC, rpoC, rho, tuf e rpoB foram validados. Após análises no BestKeeper, os genes rpoC, rpoB, proC e rho, foram categorizados como os mais estáveis. A expressão relativa do gene blaKPC, normalizada com os distintos controles endógenos, mostrou resultados semelhantes, indicando que os genes selecionados são bons normalizadores para estudos de expressão. O isolado com maior concentração inibitória mínima (CIM) para os carbapenêmicos, apresentou maiores níveis de expressão quando comparado ao isolado com menor CIM, utilizando os genes rpoC, rpoB e proC como controles endógenos.

Conclusão: Evidencia-se a importância de avaliar criteriosamente os primers descritos na literatura como etapa anterior às análises de expressão relativa, pois a estabilidade dos genes está associada a condição imposta nas análises e pode gerar resultados não-válidos, além de equívocos de entendimento dos fenótipos. Estudos de estabilidade dos genes de controles endógenos em distintas condições são de suma importância para a confiabilidade dos resultados de qPCR.

Palavras-chave: qPCR Controles endógenos Resistência bacteriana a antibióticos

https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.102845