



INTRODUÇÃO

As leveduras encapsuladas *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são os principais agentes etiológicos da criptococose. Esta doença é caracterizada por infecção pulmonar e eventual disseminação do agente etiológico para o Sistema Nervoso Central (SNC). A infecção causada por *C. neoformans* atinge pacientes imunocomprometidos, enquanto *C. gattii* possui a capacidade de infectar pacientes imunocompetentes. O principal fator de virulência dessas espécies é a produção de uma cápsula polissacarídica, a qual é composta em 1% por manoproteínas. Essas manoproteínas são capazes de induzir resposta imune mediada por células T, sugerindo que sua utilização no desenvolvimento de novas terapias contra a criptococose seja promissora. No entanto, todos os estudos funcionais de manoproteínas de *Cryptococcus sp.* existentes na literatura atualmente são provenientes de *C. neoformans*, não havendo nenhuma descrição sobre a função das mesmas em *C. gattii*. Portanto, este trabalho objetivou construir linhagens de superexpressão do gene CNBG4278, o qual codifica uma manoproteína hipotética de *C. gattii*, para posterior caracterização funcional.

RESULTADOS

Para a construção do cassete de superexpressão de CNBG4278, a sequência codificadora de CNBG4278 foi clonada sob a regulação das regiões promotora e terminadora do gene de histona H3 de *C. neoformans*. Os três fragmentos distintos foram unidos através do método de PCR *Double Joint* em um único *amplicon* de aproximadamente 2.4 kb (Figura 1A). O *amplicon* resultante foi clonado no plasmídeo pJAF1 (Figura 1B) e o vetor recombinante gerado, pJAF1_CNBG4278, foi transformado em células de *Escherichia coli* TOP10F. O *screening* das colônias selecionadas e a confirmação da construção do vetor foi realizada por extração plasmidial seguida de clivagem com as enzimas de restrição XhoI e BglIII (Figura 1C).

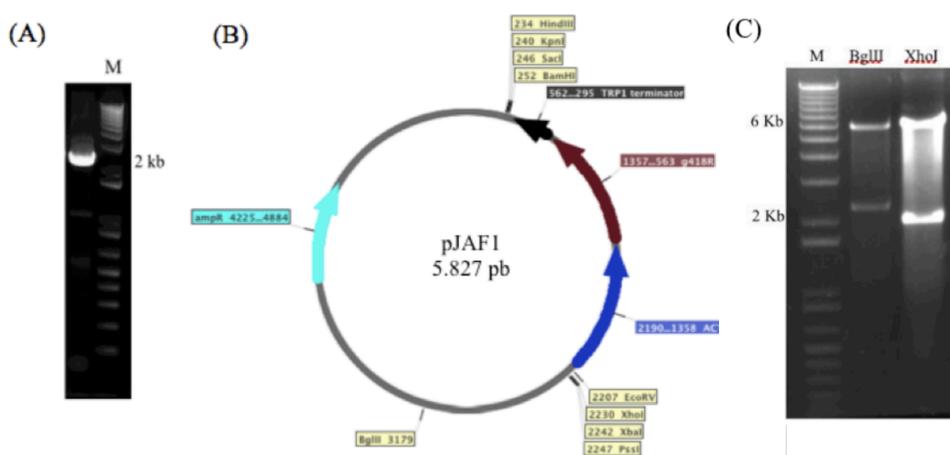


Figura 1. Amplicon de 2,4 kb, mapa do plasmídeo pJAF1 e confirmação do vetor recombinante. (A) O fragmento consiste na região promotora e terminadora da histona H3 de *C. neoformans* e na região codificadora de CNBG4278 de *C. gattii*. (B) Vetor pJAF1, o qual possui marca de resistência a gentamicina, cuja região codificadora está indicada em vermelho. (C) Clivagem do vetor pJAF1_CNBG4278. BglIII cliva o vetor em fragmentos de 5922 pb e 2297 pb e XhoI em fragmentos de 6244 pb e 1975 pb. M, marcador de tamanho molecular 1KB plus DNA ladder, indicado em pares de base.

O vetor pJAF1_CNBG4278 foi transformado pelo método de biobalística em células da linhagem *cnbg4278Δ*, mutante nulo de *C. gattii* R265 para o gene de interesse. O *screening* de transformantes foi realizado por PCR de colônia. Posteriormente, realizamos *Real Time RT-qPCR* para seis possíveis transformantes. Os três transformantes que apresentaram maiores níveis relativos de mRNA de CNBG4278 foram selecionados (*cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38 e 62) e submetidos a testes fenotípicos, juntamente com as linhagens mutante *cnbg4278Δ* e complementada *cnbg4278Δ::CNBG4278* (Figura 2).

Após a construção do mutante *cnbg4278Δ*, foi verificado que o mesmo apresentava colônia com fenótipo mucóide, característica não revertida em duas linhagens de superexpressão selecionadas (*cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19 e 62). Estas linhagens apresentaram hipersensibilidade a *Congo Red* (5 mg/mL), o que indica instabilidade da parede celular (Figura 3).

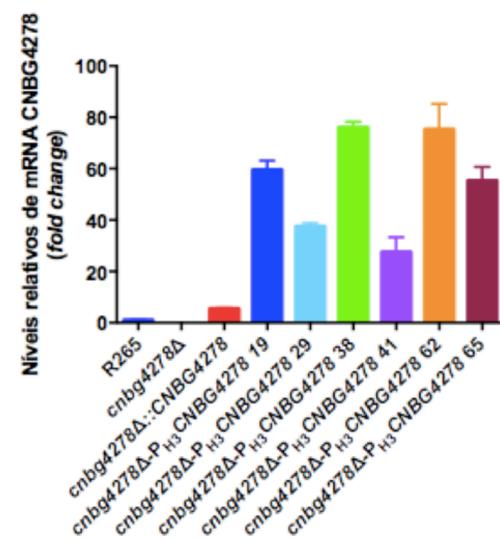


Figura 2. Níveis relativos de mRNA de CNBG4278 em mutantes de superexpressão obtidos por análise em *Real Time RT-qPCR*. A quantificação dos níveis de mRNA em cada amostra foi normalizada utilizando valores Ct obtidos para o gene da Actina. Os dados mostrados são a média de valores de triplicatas experimentais. Barras representam o desvio padrão de três réplicas técnicas.

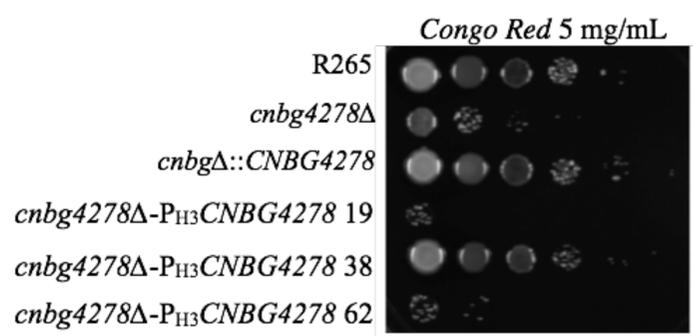


Figura 3. Teste de diluição seriada para análise da integridade da parede celular de mutantes de CNBG4278. As linhagens estudadas foram submetidas a crescimento com *Congo Red* (5 mg/mL) a 30 °C durante 48 h. Diluição seriada de 10⁷ a 10² células.

Os demais resultados dos testes fenotípicos demonstraram que CNBG4278 não interfere em:

- Mecanismos de termotolerância e tolerância a estresse osmótico e salino;
- Síntese de cápsula polissacarídica;
- Atividade de fosfolipase.

Além disso, os resultados de ensaios de fagocitose por macrófagos J774.A1 demonstraram que os mutantes de superexpressão apresentam níveis de fagocitose similares ao da linhagem selvagem R265. Também não há diferença no índice de replicação intracelular desses mutantes em relação a linhagem selvagem.

PERSPECTIVAS

- Avaliação da composição e da estrutura da cápsula polissacarídica;
- Determinação do número de cópias do vetor inseridas ao genoma dos mutantes de superexpressão;