

## INTRODUÇÃO

*Cryptococcus gattii* é uma levedura basidiomicética que, assim como a levedura *Cryptococcus neoformans*, é um dos agente etiológicos da criptococose. Esta infecção pode, além de afetar o sistema respiratório, disseminar-se para outros órgãos, ocasionando nos casos mais graves meningoencefalite (LIN *et al.*, 2006). O zinco é um micronutriente essencial para essas leveduras, pois além de ser um cofator catalítico e estrutural de muitas proteínas (EIDE, 2009), ele também atua desencadeando o processo de infecção (NOBILE *et al.*, 2009). A baixa disponibilidade de micronutrientes, como ferro, cobre e zinco, no hospedeiro é fundamental para a induzir a expressão de fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, melanização e crescimento a 37° C (JUNG & KRONSTAD, 2007). Estudos realizados na levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, demonstraram a existência de uma série de respostas homeostáticas e adaptativas à baixa concentração de zinco intracelular, entre elas a que envolve o fator de transcrição Zap 1 (EIDE, 2009). Este fator de transcrição está envolvido na captação e estoque intracelular de Zn, além de ativar genes envolvidos no mecanismo de resistência a estresse oxidativo, ocasionada pela deficiência em Zn.

## OBJETIVOS

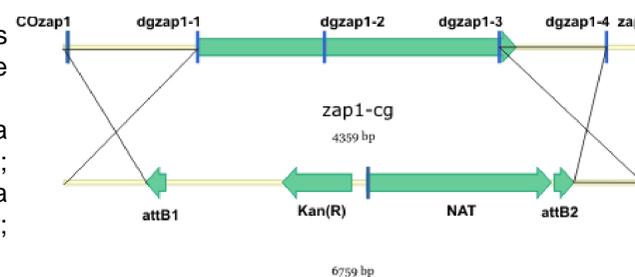
Avaliar o metabolismo de zinco em *C. gattii*, através da estudos funcionais do fator de transcrição Zap1.

## MATERIAIS E METÓDOS

**Construção de uma linhagem mutante do gene *Zap1*:** Primers foram projetados para amplificação de sequências flanqueadoras do gene *zap1* de *C. gattii* e utilizadas na construção do vetor pΔzap1 pela metodologia Delsgate (Figura 1). Para identificar os mutantes que tiveram o gene *zap1* inativado foi realizado PCR.

**Ensaio fenotípicos:** Os mutantes que confirmaram a inativação do gene foram submetidos a diferentes testes para avaliar seus fenótipos em relação a linhagem selvagem R265. Entre os testes: desenvolvimento a 30° e 37° C; melanização; formação de cápsula; sensibilidade a peróxido de hidrogênio; capacidade de desenvolvimento na ausência de zinco; urease (com e sem Zn); sensibilidade a CaCl<sub>2</sub> 400mM; sensibilidade a Congo Red e a Calcoflúor; sensibilidade a SDS e sensibilidade a Manadiona.

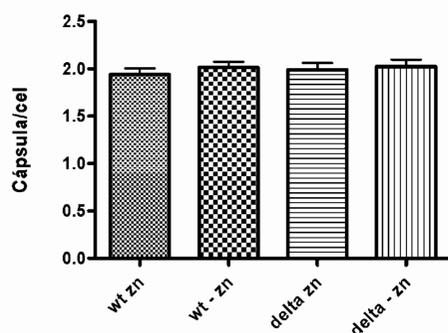
**Ensaio enzimáticos:** A linhagens R265 e ΔZap1 foram cultivadas em meio LZM por 24h. Os extratos protéicos foram avaliados quanto a atividade de catalase, peroxidase e SOD, conforme descrito (SANTI *et al.* 2010). Os dados foram normalizados por quantidade de proteína, de acordo com quantificação no sistema QuBIT (Invitrogen).



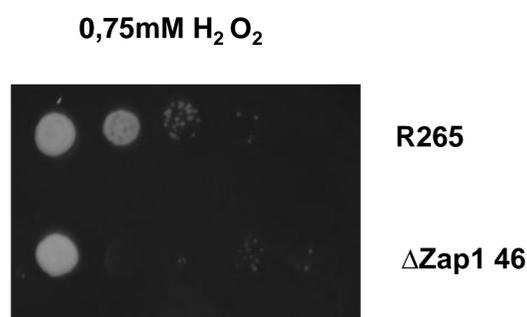
**Figura 1. Esquema de *knockout* do gene *Zap1* de *C. gattii*.** Estão representados o *locus* genômico, o vetor de inativação e os *primers* utilizados na confecção do vetor.

## RESULTADOS

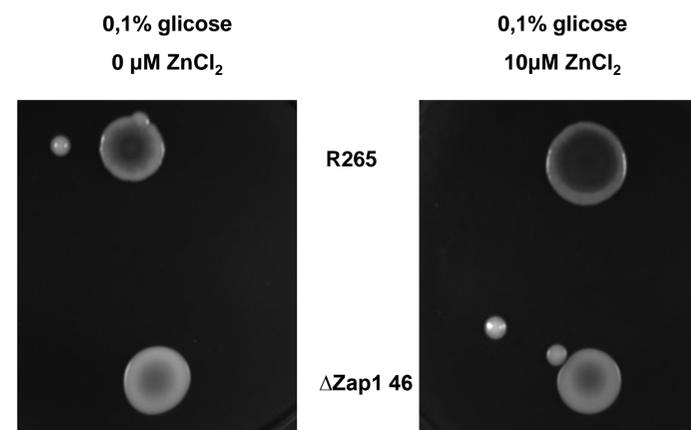
As análises feitas, com base nos resultados do PCR, revelaram a inativação do gene *zap1* em dois mutantes (Δzap1-46 e Δzap1-58). Estes mutantes não revelaram diferença significativa do seu fenótipo quando comparados a linhagem selvagem nos seguintes testes: desenvolvimento a 30° e 37° C; formação de cápsula (Figura 2); capacidade de desenvolvimento em meio LZM (com e sem Zn); atividade de urease (com e sem Zn); sensibilidade a CaCl<sub>2</sub> 400mM; sensibilidade a Congo Red (0,1%; 0,25%; 0,5%); sensibilidade a Calcoflúor (0,1%; 0,25%; 0,5%); sensibilidade a SDS (0,1%; 0,25%; 0,5%) e sensibilidade a Manadiona (1; 5 e 10 μg/ml). Porém, o mutante Δzap1-46 demonstrou-se sensível ao peróxido de hidrogênio (0,75 mM), além de não melanizar em condições favoráveis a melanização.



**Figura 2. Teste de formação de cápsula.** Células da linhagem selvagem e mutante foram inoculadas em meio indutor de cápsula e, após 24 h, analisadas quanto ao tamanho da cápsula por coloração com tinta nanquim. A relação entre o tamanho da cápsula e o da célula foi realizado para 100 células.



**Figura 3. Teste de sensibilidade a peróxido de hidrogênio 0,75 mM.** Diluições seriadas da linhagem selvagem R265 e a linhagem ΔZap1 46 foram inoculadas em meio YPD contendo peróxido de hidrogênio e incubadas por até 48h a 30°C.



**Figura 4. Teste de melanização.** Células cultivadas em meio YPD foram inoculadas em meio mínimo contendo 1 mM L-DOPA e incubadas por até 120h a 30°C.

Com os resultados obtidos nos testes de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio e produção de melanina, o mutante ΔZap1-46 foi selecionado para avaliar a atividade de enzimas associadas ao metabolismo de espécies reativas de oxigênio. Nestes testes foram avaliadas a atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase. Neste teste ficou evidente a redução da atividade da catalase no mutante, revelando a possível influência do fator de transcrição Zap 1 na atividade desta enzima (Tabela 1).

CATALASE		PEROXIDASE		SOD	
WT	<i>zap1Δ</i>	WT	<i>zap1Δ</i>	WT	<i>zap1Δ</i>
0.062±0.007	0.008±0.000	0.059±0.002	0.046±0.002	0.296±0.003	0.338±0.053

**Tabela 1. Ensaio antioxidantes.** Valores normalizados da atividade enzimática. Média de dois experimentos independentes seguida do desvio padrão.

## PERSPECTIVAS

- Construção da linhagem complementada do mutante ΔZap1 46;
- Ensaio de virulência em modelos *ex vivo* (macrófagos) e *in vivo* (camundongos).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EIDE, D. J. Homeostatic and adaptative responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 28, p.18565–18569, 2009.

GARCÍA-PEDRAJAS, M.D. *et al.* DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. *Fungal Genetics and Biology*, v.45, p.379-388, 2008.

JUNG, W.H & KRONSTAD, J.W. Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cellular Microbiology*, vol.10, no.2, pg. 277-284, 2007.

LIN, X. *et al.* The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, v. 60, p. 69-105, 2006.

NOBILE, C. J. *et al.* Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biology*, vol. 7, no.6, 2009.

SANTI, L. *et al.* Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, v. 55, no. 4, p.874-880, 2010.