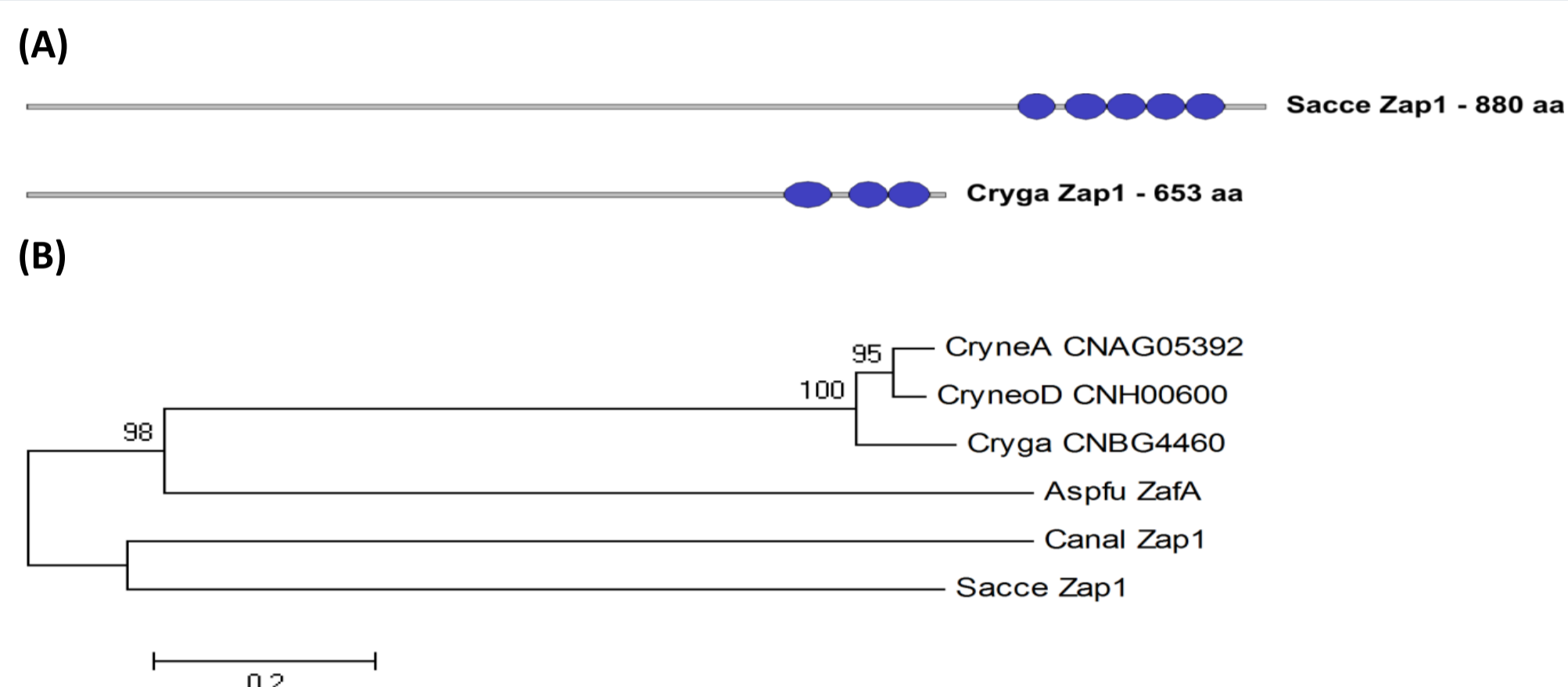


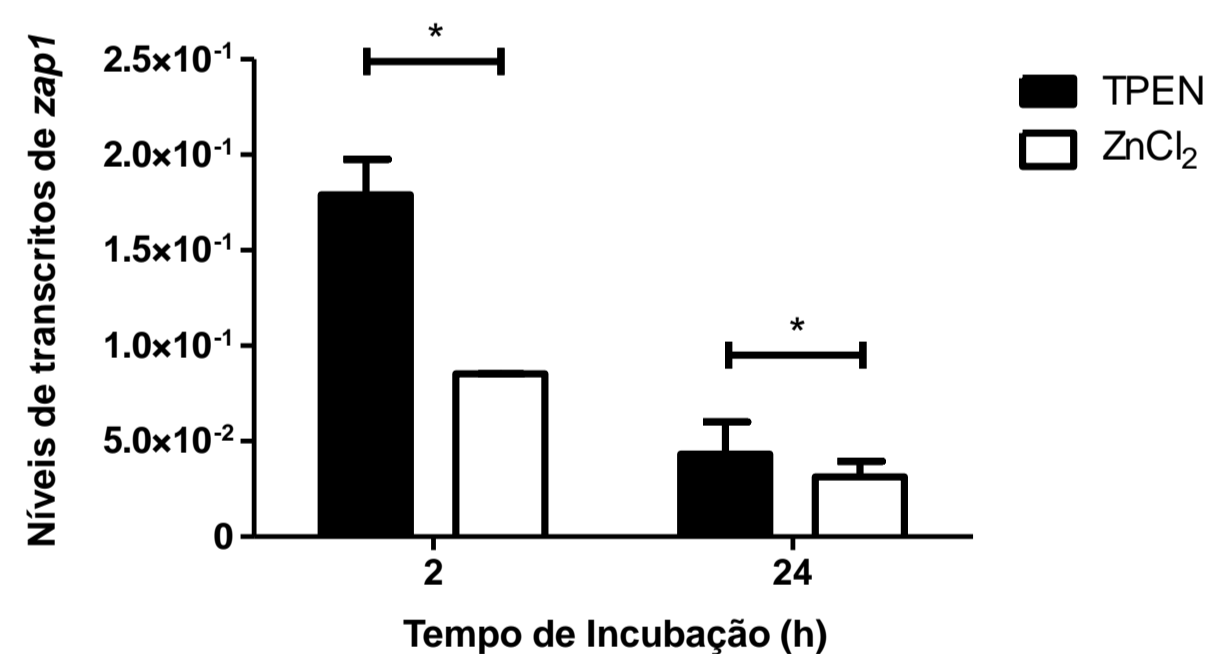
## INTRODUÇÃO

*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são leveduras basidiomicéticas que causam a criptococose, patologia que pode acometer diferentes órgãos do hospedeiro, incluindo pele, pulmões e o sistema nervoso central. Apesar de *C. neoformans* acometer tipicamente indivíduos imunocomprometidos e *C. gattii*, indivíduos imunocompetentes, o ciclo infeccioso é o mesmo e a etapa inicial se dá pela deposição de partículas infecciosas nas vias aéreas do hospedeiro (Kronstad *et al.*, Nat Rev Microbiol 93:193-203, 2011). Neste ambiente, o microrganismo se depara com diversas limitações impostas pelo hospedeiro para conter o progresso da infecção, especialmente a limitação de nutrientes (Weinberg, Biochim Biophys Acta 1790:600-605, 2004). Visto que a privação de zinco constitui um exemplo de imunidade nutricional (Kehl-Fie e Skaar, Curr Opin Chem Biol 14:218-224, 2010), os mecanismos de captação e metabolismo deste metal possivelmente estão relacionados ao processo de interação patógeno-hospedeiro em espécies do gênero *Cryptococcus*. O objetivo desse estudo é analisar os genes envolvidos na regulação do metabolismo de zinco em *C. gattii*. Para isso, os níveis de transcrito do gene *CgZap1*, ortólogo do fator de transcrição ZAP1, regulador do metabolismo de zinco em *Saccharomyces cerevisiae* (Eide, J Biol Chem 284: 18565-18569, 2009), foram avaliados após cultivos de *C. gattii* em meio privado de zinco ou na presença deste metal. Como resultado, pode-se averiguar que, na ausência de zinco, os níveis de transcrito de *CgZAP1* aumentam em comparação a meios contendo zinco. Para melhor caracterizar o papel do gene *CgZAP1* de *C. gattii*, mutantes nulos foram construídos. Para avaliar se o fator de transcrição *CgZAP1* está associado ao metabolismo de zinco, curvas de crescimento na ausência e na presença de zinco foram realizadas; as linhagens mutantes foram mais sensíveis à ausência de zinco. Em relação aos fatores de virulência clássicos de *C. gattii*, pode-se averiguar um aumento da produção de melanina no mutante *Cgzap1Δ*. Foi possível observar que o mutante *Cgzap1Δ* foi mais resistente ao agente depletor de glutatona dietilmalato, sugerindo que *CgZap1* regula o metabolismo de espécies reativas de oxigênio em *C. gattii*. Foi avaliada também a atividade das linhagens selvagem e mutante em modelos de infecção murino, confirmando a participação desta proteína no processo de infecção.

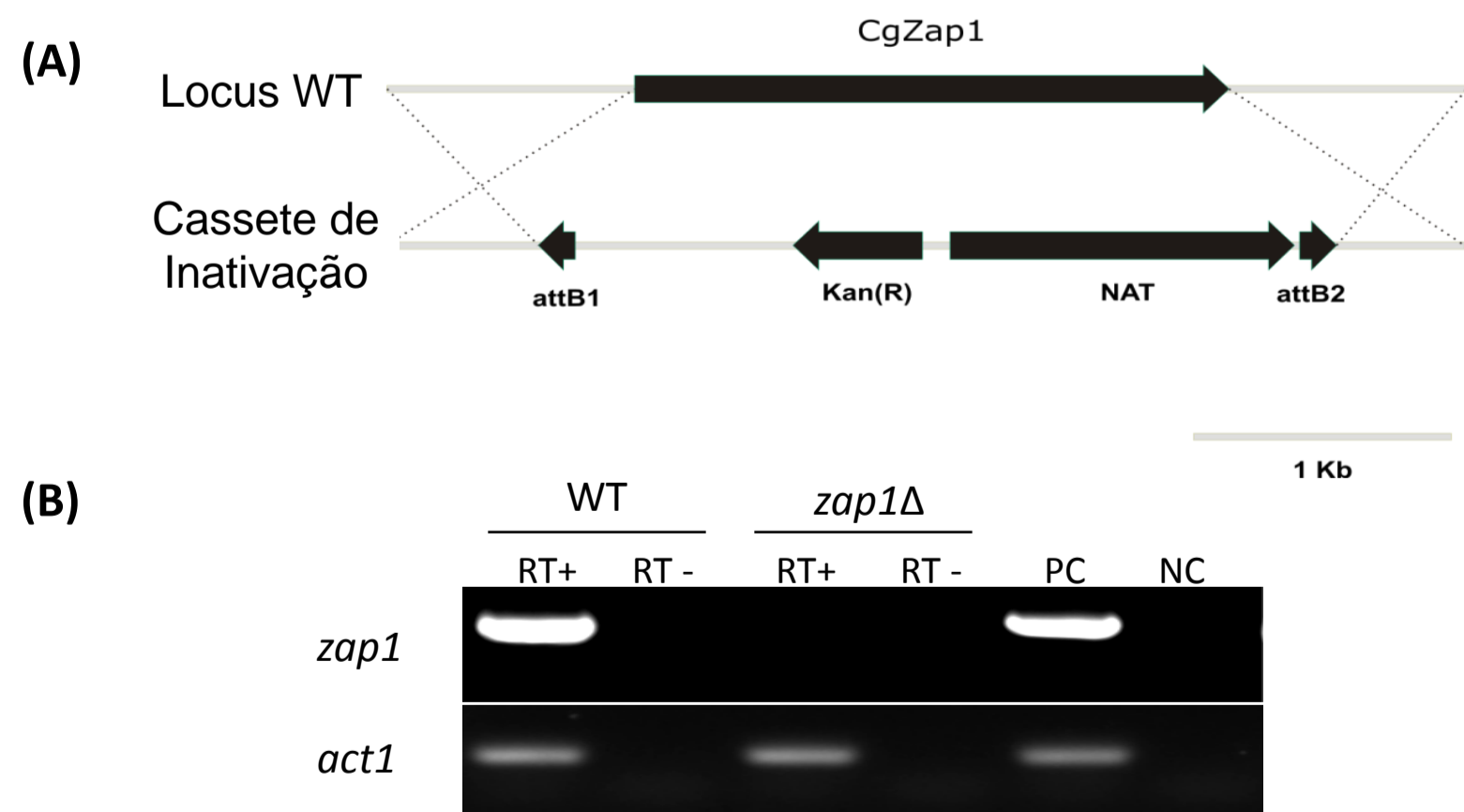
## RESULTADOS



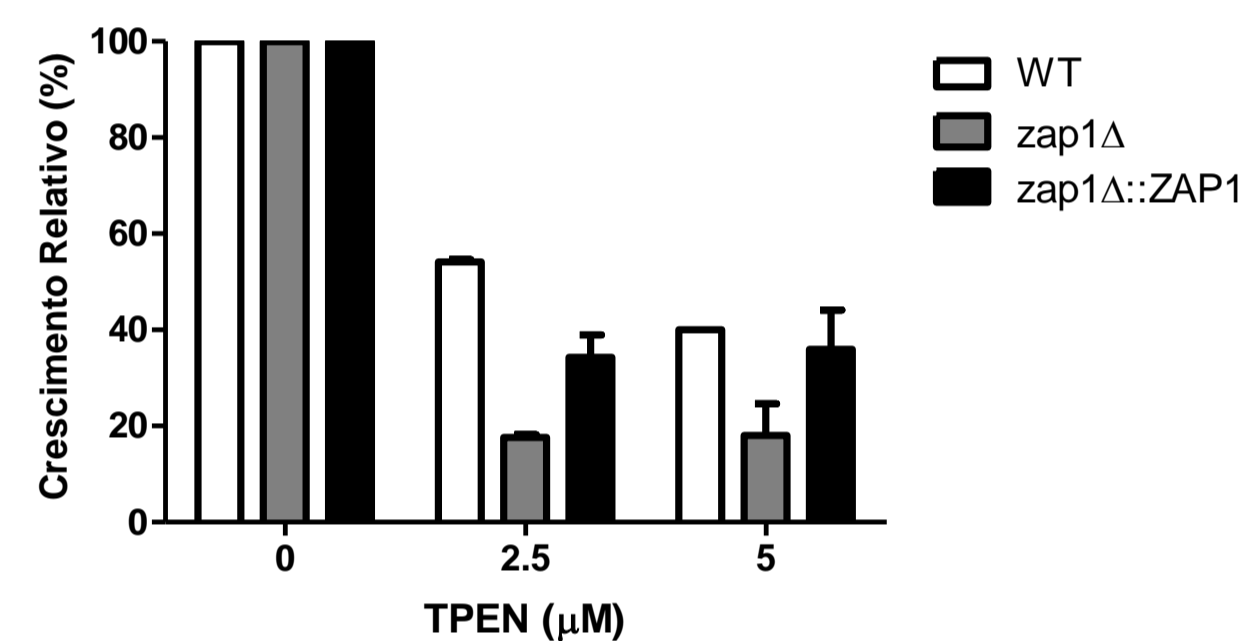
**Figura 1. Identificação do gene ZAP1 em *Cryptococcus gattii*.** (A) Proteínas de Zap1 deduzidas de *Saccharomyces cerevisiae* e o ortólogo de *C. gattii* foram avaliados para a presença de domínios conservados de dedo de zinco (azul). (B) Análise filogenética pelo método de Neighbor-Joining, incluindo sequências de Zap1 de fungos distintos. A barra indica a distância genética, que é proporcional ao número de substituições de aminoácidos. Arquitetura da árvore inferida a partir de 1000 bootstraps.



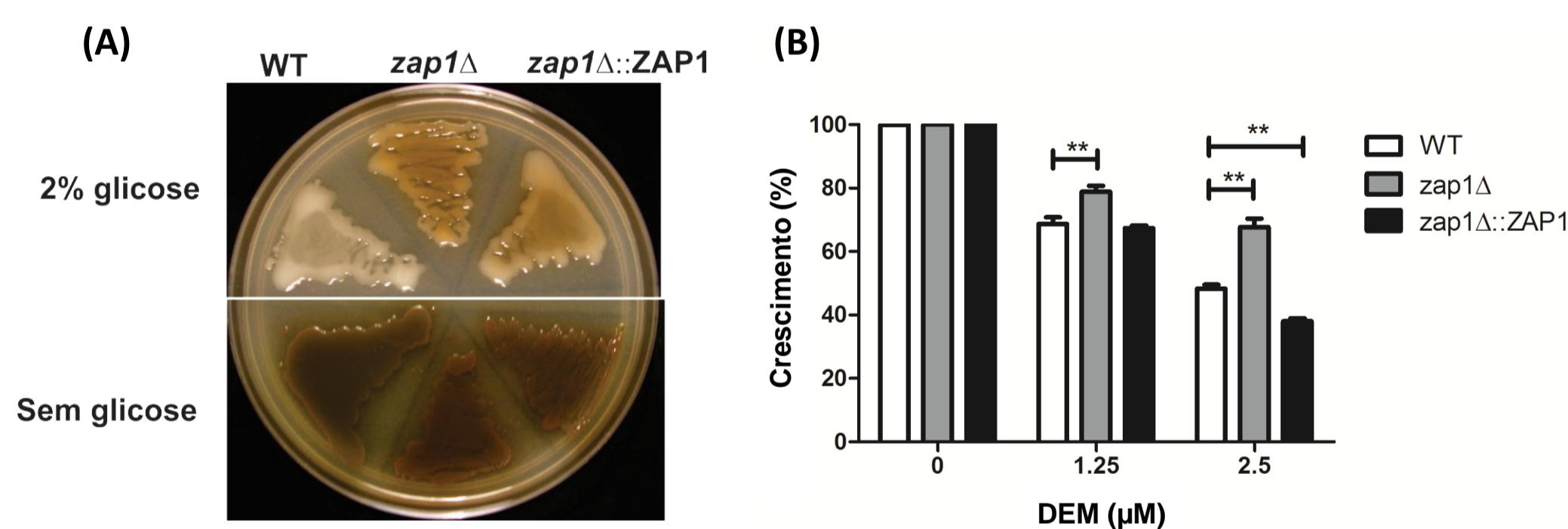
**Figura 2. Níveis de transcritos do gene *CgZAP1* são regulados pelos níveis de zinco.** qRT-PCR para avaliar os níveis de transcrição do gene Zap1 em LZM ou LZM + 1 μM de ZnCl<sub>2</sub>. A quantificação relativa foi realizada pelo método 2<sup>-ΔΔCT</sup>, utilizando a transcrição da actina como referência. Média obtida de duas réplicas biológicas.



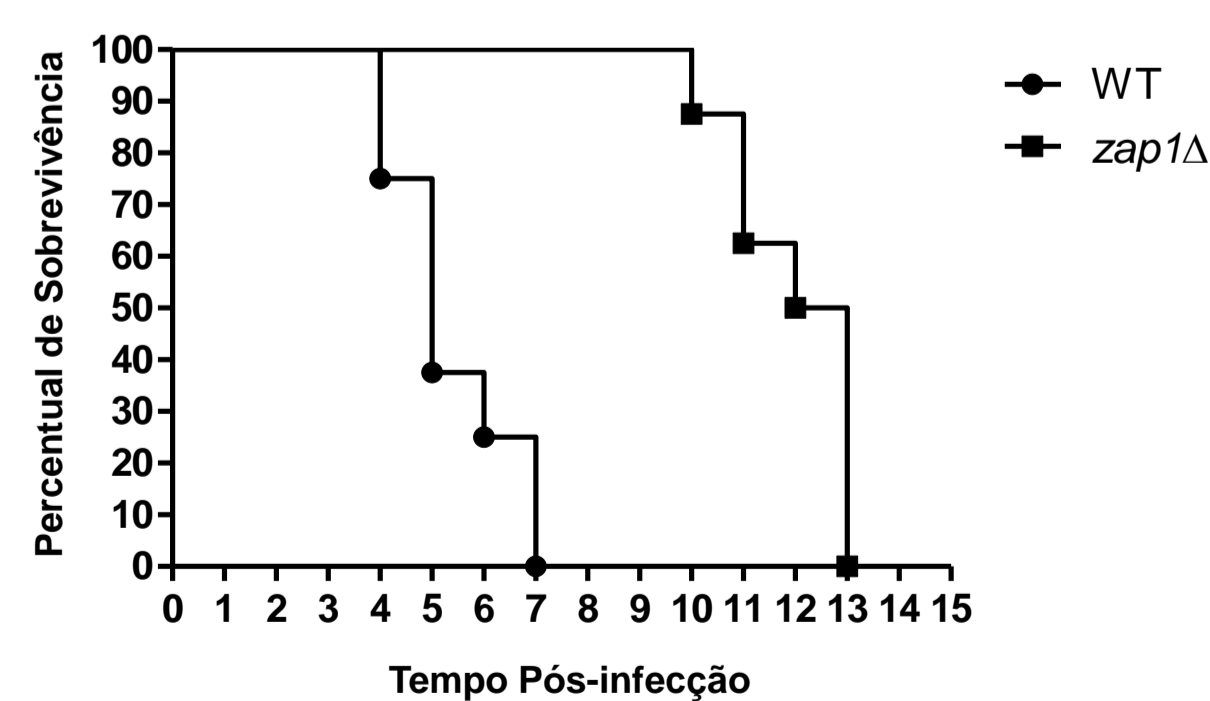
**Figura 3. Construção de mutantes nulos *Cgzap1Δ*.** (A) Esquema da deleção de Zap1. O vetor de inativação foi construído pela metodologia de Delsgate. As regiões 5' e 3' flangeadoras do gene Zap1 foram amplificadas e clonadas no vetor pDNOR-NAT. (B) RT-PCR semiquantitativo utilizando o cDNA da linhagem selvagem e da linhagem mutante como molde. A parte superior representa amplicons do cDNA de Zap1, enquanto a parte inferior representa o cDNA de act1, utilizado como controle normalizador. Reações de transcrição reversa com a adição (RT+) ou ausência (RT-) de transcriptase reversa foram incluídas como controle. PC e NC representam o controle positivo e o controle negativo, respectivamente.



**Figura 4. *CgZAP1* é necessário para o desenvolvimento de *C. gattii* em condições de privação de zinco.** As linhagens selvagem (WT), mutante (*zap1Δ*) e complementada (*zap1Δ::ZAP1*) foram cultivadas em YNB ou YNB contendo diferentes concentrações de TPEN em uma OD<sub>600</sub> inicial de 0,05. Após incubação a 30°C por 24 h, a OD<sub>600</sub> foi determinada. Valores obtidos de três réplicas biológicas.



**Figura 5. *CgZap1* regula negativamente a resposta antioxidante.** As linhagens selvagem (WT), mutante (*zap1Δ*) e complementada (*zap1Δ::ZAP1*) foram cultivadas em ágar niger sem glicose ou contendo 2% de glicose (A) para avaliar a melanização em um período de 48h a 30°C ou em meio YNB contendo dietilmalato, um depletor de glutatona (B) por 24h a 30°C.



**Figura 6. O gene *CgZAP1* é necessário para a virulência de *C. gattii* em modelos murinos de infecção intranasal.** Camundongos BALB/c foram infectados por via intranasal com 10<sup>7</sup> células de WT ou *zap1Δ*. A mortalidade foi registrada diariamente e analisada pelo método de Kaplan-Meier.