



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2013
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Avaliação da disponibilidade de Cobre em macrófagos durante a interação com <i>Cryptococcus neoformans</i>
<b>Autor</b>	MATHEUS DE BASTOS BALBÉ E GUTIERRES
<b>Orientador</b>	CHARLEY CHRISTIAN STAATS

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura basidiomicética patogênica cuja infecção afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos. Seus diversos fatores de virulência incluem expressão de melanina, capacidade de desenvolvimento à temperatura de 37°C, produção de cápsula polissacarídica e sobrevivência no interior de macrófagos. Estas células do sistema imune expõem o micro-organismo a diversos tipos de estresse, sendo um deles o nutricional, pelo qual o macrófago restringe micronutrientes essenciais, como metais de transição, do interior do fagolisossomo. Metais de transição são indispensáveis para qualquer organismo, sendo frequentemente incorporados em metaloproteínas ou transportados para diferentes compartimentos da célula pela atividade de transportadores. Existem muitos estudos referentes ao impacto da viabilidade de ferro em infecções bacterianas e fúngicas, porém evidências apontam que cobre (Cu) também desempenha um papel importante na virulência de micro-organismos e pouco se sabe sobre os mecanismos envolvendo este metal. O projeto no qual este trabalho se insere tem como objetivo principal a avaliação da modulação da homeostase de Cu em macrófagos ocasionada pela infecção com *C. neoformans*. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de biossensores para avaliar a disponibilidade de cobre no interior de macrófagos infectados com *C. neoformans*. Para tanto, foi realizada uma construção para expressão da proteína fluorescente mCherry sob o controle do promotor do gene *CTR4* de *C. neoformans*, o qual codifica para um transportador de Cu cuja expressão é ativada em condições limitantes deste metal. A partir do DNA genômico da linhagem H99 de *C. neoformans*, a sequência do promotor deste gene foi amplificada por PCR, posteriormente purificada e clivada, para inserção no vetor pLKB25, o qual contém a ORF da mCherry a montante de um terminador constitutivo, assim como a marca para seleção. Após a digestão do plasmídeo, as sequências de interesse foram então purificadas e submetidas à ligação. Células competentes de *E. coli* foram então transformadas por choque-térmico. Os clones positivos foram caracterizados por clivagem com enzimas de restrição e PCR. Por meio de biobalística, foram então transformadas células de *C. neoformans* e linhagens resistentes à marca de seleção foram cultivadas em meio YNB líquido acrescido ou não do quelante de Cu, BCS. Foram obtidos alguns transformantes com intensa fluorescência vermelha quando cultivados na ausência de cobre apenas, o que corrobora o padrão de expressão deste gene. Como perspectivas a avaliação da quantidade de sequências inseridas deve ser analisada por meio de *Southern blot*, e deve também ser realizadas interações com macrófagos para posterior detecção de fluorescência.