



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2015: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2015
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Caracterização funcional de transportadores de zinco de <i>Cryptococcus gattii</i>
<b>Autor</b>	CAMILA DIEHL DA ROSA
<b>Orientador</b>	CHARLEY CHRISTIAN STAATS

## Caracterização funcional de transportadores de zinco de *Cryptococcus gattii*

Camila Diehl da Rosa  
Prof. Dr. Charley Christian Staats  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Uma importante patologia de etiologia fúngica é a criptococose, ocasionada pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Recentemente, foi mostrado por nosso grupo que o adequado metabolismo de zinco em *C. gattii* é fundamental para o seu potencial infectivo. As proteínas codificadas pelos genes *ZIP1* e *ZIP2*, transportadoras deste metal, participam ativamente no desenvolvimento de *C. gattii* em condições de privação de zinco, ocasionada pela adição do quelante de baixa afinidade BPDS. Neste contexto, a expressão destes transportadores pode ser regulada quando células de *C. gattii* são submetidas ao cultivo de privação de metais. Frente ao papel essencial do zinco, torna-se necessário o maior conhecimento do metabolismo desse metal. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a modulação da homeostase do metal zinco em *C. gattii* e a sua influência na virulência dessa linhagem, assim como caracterizar funcionalmente genes transportadores deste metal. Este trabalho foi realizado utilizando mutantes nulos de *C. gattii* para os transportadores de zinco da família ZIP codificados pelos genes *ZIP1* e *ZIP2*, assim como o mutante duplo para os genes *ZIP1* e *ZIP2*. Para avaliar se estas linhagens apresentavam menores quantidades de zinco intracelular, realizamos ensaios empregando o agente ditizona, capaz de corar as colônias fúngicas de vermelho de acordo com a quantidade de zinco nas células. As células da linhagem R265 WT, mutantes e mutantes complementados foram cultivadas em meio YNB, YNB com adição de 100  $\mu\text{M}$  de quelante DTPA ou YNB com adição de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  e colocadas posteriormente em contato com o agente ditizona. Foi observada coloração em todas as linhagens quando cultivadas em meio YNB com adição de  $\text{ZnCl}_2$ , ao passo que esta coloração foi ausente no cultivo em YNB+DTPA. O cultivo em YNB levou à formação de coloração vermelha apenas nas linhagens WT, mutante para o gene *ZIP2* (*zip2 $\Delta$* ), assim como para os mutantes complementados dos genes *ZIP2* e *ZIP1*. Estes dados confirmam que mutantes para o gene *ZIP1* possuem menores concentrações intracelulares de zinco. Para analisar se a expressão dos genes *ZIP1*, *ZIP2* e *ZIP3* são influenciadas pela disponibilidade ou privação de zinco e se a expressão de algum desses genes responde de maneira mais específica a este metal, foram realizados ensaios de expressão gênica destes genes. Para tanto, foi extraído RNA de cultivos da linhagem WT em condições controle (meio YNB), privação de zinco (adição de 100  $\mu\text{M}$  de quelante DTPA), condições com 100  $\mu\text{M}$  de quelante DTPA suplementado com 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  ou 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  e condições de YNB suplementado com 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  ou 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ . Todas as análises de expressão foram realizadas empregando *Real Time* PCR. Um aumento dos níveis relativos de transcrito foi detectado quando as células foram cultivadas na condição de privação de zinco para os genes *ZIP1* ( $p < 0,05$ ), *ZIP2* ( $p < 0,01$ ) e *ZIP3* ( $p \leq 0,001$ ) em relação à condição controle. Os níveis de expressão de *ZIP1* mostraram redução significativa quando adicionado  $\text{ZnCl}_2$  ao meio contendo quelante DTPA ( $p < 0,05$ ), mas não houve redução significativa nos níveis de expressão quando adicionado  $\text{FeCl}_3$  ao meio nas mesmas condições, sugerindo que a proteína codificada pelo gene *ZIP1* esteja associado ao transporte de zinco. A adição de 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  ou  $\text{FeCl}_3$  no cultivo não alterou de forma significativa os níveis relativos de transcrito em relação à condição controle, confirmando que esta diminuição decorrente da adição de metais no meio de cultivo contendo quelante DTPA é devido a disponibilidade do metal e não a saturação do quelante.