

RESUMO

Criptococose é uma infecção fúngica de alta importância clínica frequentemente manifestada como pneumonia, podendo estar associada à meningoencefalite e levar o paciente ao óbito. Dentre os agentes etiológicos causadores desta doença, a levedura *Cryptococcus gattii* possui maior incidência de infecção em pacientes imunocompetentes, quando comparada a *Cryptococcus neoformans*. Acreditava-se que a distribuição geográfica de *C. gattii* era limitada às regiões tropicais e subtropicais, porém, na última década, diferentes linhagens de *C. gattii* foram isoladas em regiões de clima temperado, incluindo países da Europa e América. O sucesso da infecção por essa levedura é devido à produção de inúmeros fatores de virulência como, por exemplo, a síntese de uma cápsula polissacarídica, capacidade de formar biofilme, síntese de melanina e crescimento a 37 °C. *Heat Shock Proteins* (Hsp) já foram descritas por atuarem de forma a influenciar esses fatores de virulência. Em *Candida albicans*, constatou-se a influência das Hsps na formação de biofilme e resistência à drogas antifúngicas. Em *C. neoformans*, Hsps atuam diretamente na virulência devido o aumento de expressão de diferentes proteínas dessa classe (Hsp12, Hsp60, Hsp70 e Hsp90) em modelo murino de criptococose e também na sinalização celular em resposta a diferentes estresses. Considerando o exposto, este trabalho tem por objetivo selecionar e caracterizar funcionalmente um gene potencialmente importante para a fisiologia celular e virulência de *C. gattii*.

RESULTADOS

Dados anteriores do grupo estão relacionados à análise de RNAseq obtido de lavado broncoalveolar de camundongos da linhagem BALB/c infectados por *C. gattii* linhagem R265. Dois genes, dentre os mais expressos a partir do cálculo de FPKM, foram selecionados, sendo estes os genes CNBG_2441 e CNBG_5006. O gene CNBG_2441 codifica uma pequena Hsp putativa (*small Hsp*), enquanto CNBG_5006 codifica uma proteína de sinalização relacionada à resposta a situações de estresse. Com a finalidade de selecionar o gene alvo deste estudo, foi feita a avaliação da expressão relativa dos mesmos nas condições de choque térmico, interação com macrófagos J774A.1 e exposição à concentração sub-inibitória de fluconazol.

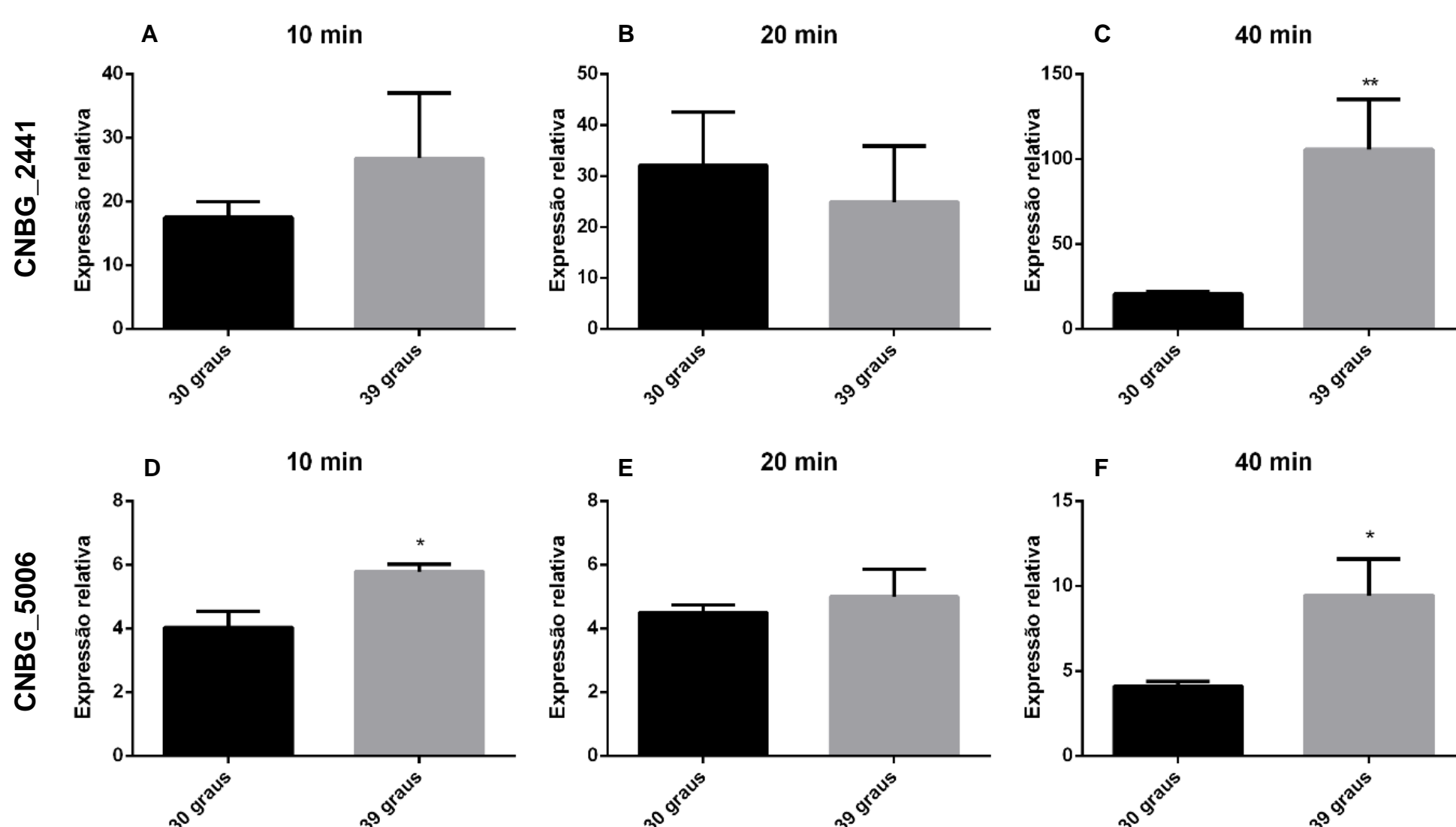


Figura 1. Expressão relativa dos genes CNBG_2441 e CNBG_5006 de *C. gattii* em condição de choque térmico durante 10, 20 e 40 minutos. (A, B e C) Expressão relativa do gene CNBG_2441 durante choque térmico de 10, 20 e 40 minutos respectivamente, sendo que em quarenta minutos há aumento significativo de sua expressão. Teste t, P<0,05. (D, E e F) Expressão relativa do gene CNBG_5006 durante choque térmico de 10, 20 e 40 minutos, sendo que CNBG_5006 apresenta maior expressão durante os tempos de 10 e 40 minutos. Teste t, P<0,05.

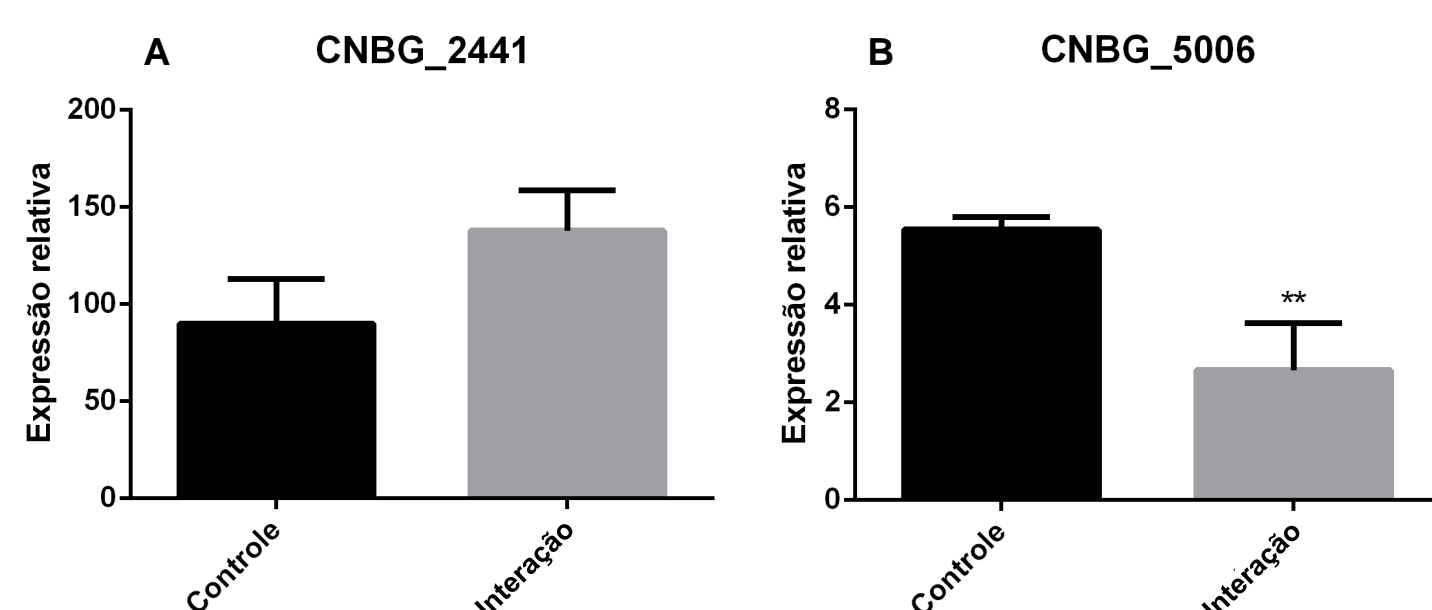


Figura 2. Expressão relativa dos genes CNBG_2441 e CNBG_5006 de *C. gattii* em condição de interação com macrófagos da linhagem J774A.1. (A) Níveis de expressão relativa do gene CNBG_2441 (B) Níveis de expressão relativa do gene CNBG_5006 que apresenta redução em sua expressão quando comparado com o controle. Teste t, P<0,05.

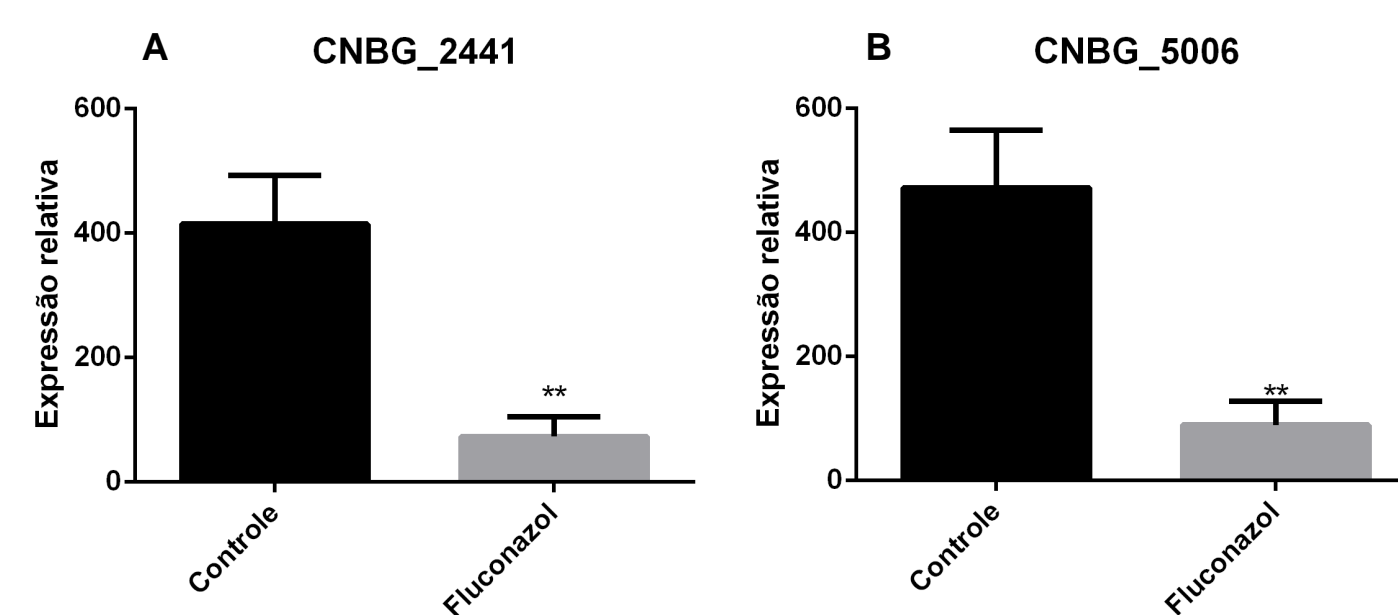


Figura 3. Expressão relativa dos genes CNBG_2441 e CNBG_5006 de *C. gattii* em concentração sub-inibitória de fluconazol. (A) A expressão relativa do gene CNBG_2441 é significativamente menor na presença de concentração sub-inibitória comparado com o controle. (B) A expressão relativa do gene CNBG_5006 é significativamente menor na presença de concentração sub-inibitória comparado com o controle assim como CNBG_2441. Teste t, P<0,05.

Considerando os resultados expostos e frisando a tendência de aumento na expressão de CNBG_2441 em condição de interação com macrófagos J774A.1, optou-se por dar continuidade ao projeto utilizando-o como gene alvo para análise funcional a partir da construção de um mutante nulo para o mesmo. O vetor de deleção foi construído através da clonagem das regiões 5' e 3' do gene no vetor pDONR_NAT com marca de resistência a nourseotricina. A construção do vetor foi confirmada por padrão de clivagem com enzimas de restrição e células de *C. gattii* foram transformadas por técnica de biolística.

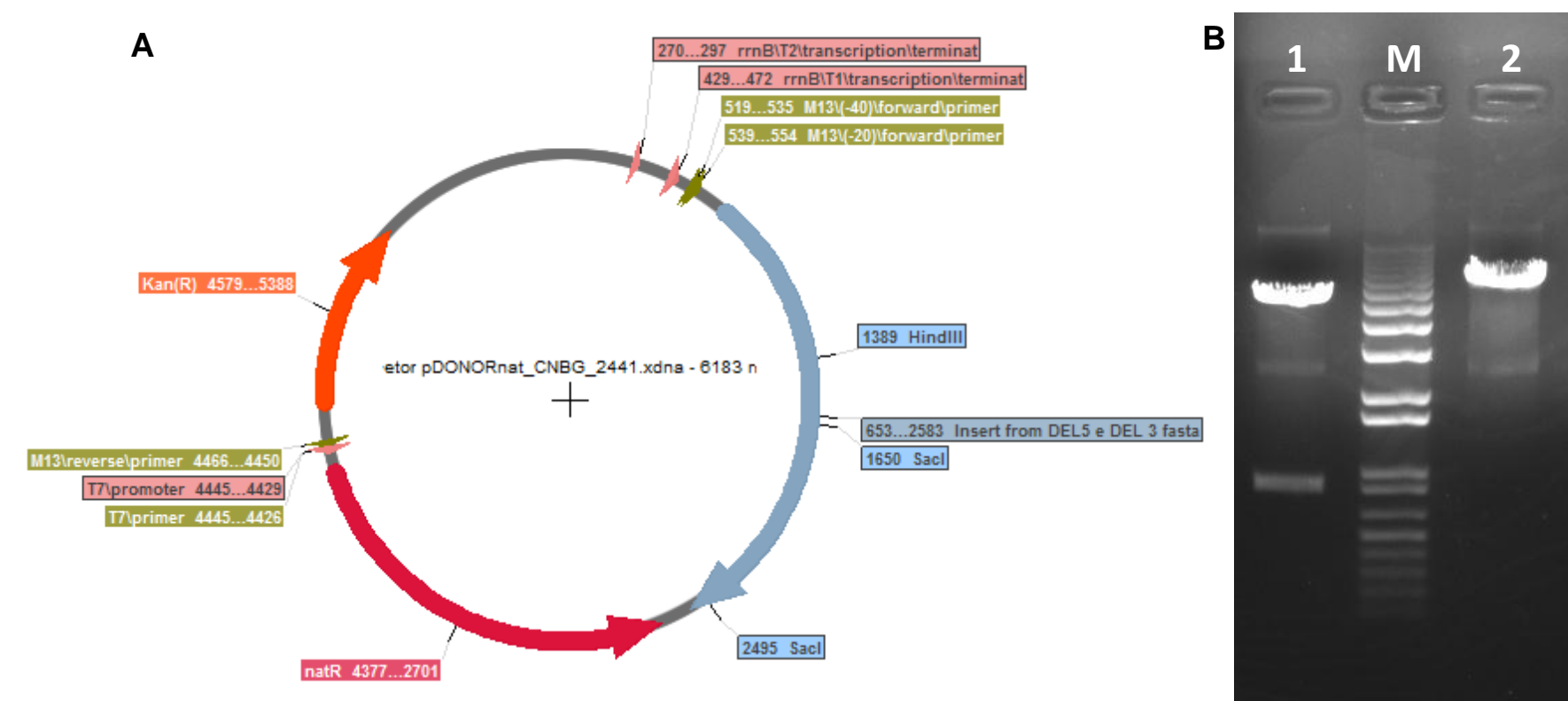


Figura 4. Mapa do vetor de deleção de CNBG_2441 e confirmação da construção do vetor. (A) Vetor expressão pDONORnat_CNBG_2441. (B) Confirmação da construção do vetor através da clivagem com SacI, que lineariza o vetor gerando um fragmento de 6.183 pb e com HindIII gerando dois fragmentos de 5.338 e 845 pb consecutivamente. 1, clivagem com HindIII; M, marcador de tamanho molecular de 1 kb plus DNA ladder; 2, Linearização com SacI;

PERSPECTIVAS

- Confirmação do mutante nulo;
- Construção de linhagem complementada;
- Ensaios de avaliação fenotípica das linhagens nula e complementada.

APOIO FINANCEIRO