

INTRODUÇÃO

As leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os agentes etiológicos da criptococose, uma infecção que pode acometer os pulmões, podendo evoluir para um quadro de meningo-encefalite. Acredita-se que a rota de infecção inicia-se nos pulmões, com a inalação de esporos ou leveduras dissecadas, porém o processo de disseminação no hospedeiro ainda não é totalmente elucidado (Ma e May, 2009). Dentre as metodologias utilizadas para a determinação das vias de disseminação de microrganismos patogênicos em seus hospedeiros, destaca-se a bioluminescência. Trata-se de um fenômeno comum em muitos organismos causado pela liberação de fótons de luz resultantes da reação de oxidação da luciferina. Essa reação é catalisada por diferentes enzimas genericamente denominadas luciferases, as quais podem ser encontradas em diferentes organismos, mas não em mamíferos (Sato *et al.*, 2004). A expressão de luciferase recombinante em microrganismos patogênicos, associada a um substrato derivado da luciferina, permite então localizar o patógeno devido à emissão de fótons de luz (Hutchens e Luker, 2007).

OBJETIVOS

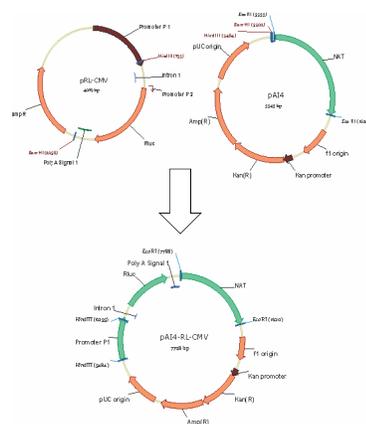
O objetivo deste estudo é construir linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* que expressam a luciferase Renila recombinante visando compreender os mecanismos de disseminação destas leveduras no hospedeiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

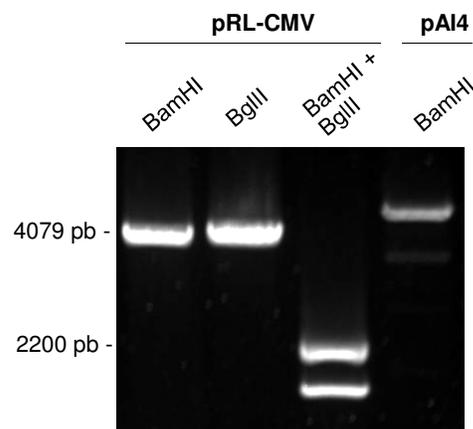
Construção do vetor para expressão da luciferase Renila nas leveduras *C. gattii* e *C. neoformans*: Esta clonagem foi realizada pela digestão do vetor pRL-CMV (Promega), o qual contém a região codificante da luciferase de *Renilla xxx* sob controle do promotor imediato do vírus CMV, com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Bam*HI. O fragmento de aproximadamente 2200 pb foi então purificado após eletroforese em gel de agarose. Este fragmento está sendo subclonado no vetor pAI4, o qual contém um cassette para expressão da resistência a nourseotricina (Idnurm *et al.*, 2004).

RESULTADOS

Estratégia para construção do vetor pAI4-RL-CMV



Clivagem dos vetores pRL-CMV e pAI4 para construção do vetor pAI4-RL-CMV



PERSPECTIVAS

- Construção e caracterização dos vetores
- Transformação das leveduras patogênicas *C. neoformans* e *C. gattii*
- Utilização das linhagens para infecção e avaliação da disseminação por acompanhamento da luminescência

REFERÊNCIAS

- Hutchens, M.; e Luker, G. (2007). Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cellular Microbiology* 9:2315-2322.
- Idnurm, A.; Reedy, J.L.; Nussbaum, J.C.; e Heitman, J. (2004) *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryotic Cell* 3:420-429.
- Ma, H.; e May, R.C. (2009). Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in Applied Microbiology* 67:131-190.
- Sato, A.; Klaunberg, B.; e Tolwani, R. (2004). In Vivo Bioluminescence Imaging. *Comparative Medicine* 54:631-634.

SUPORTE