

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada que causa quadros severos de meningoencefalites ou meningites em pacientes imunocomprometidos e é a causa mais prevalente de criptococose humana, contabilizando mais de 95% de casos de criptococose ao redor do mundo. Em trabalho prévio do grupo foram identificadas proteínas imunogênicas presentes em soro de pacientes com criptococose, dentre elas a catalase. Catalase é uma enzima conservada, cuja função está relacionada à proteção da célula contra estresse oxidativo ocasionado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). Devido à sua função, ela foi relacionada com a virulência em certos fungos patogênicos humanos, como *Aspergillus fumigatus* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Esta proteína localiza-se principalmente no citoplasma das células fúngicas. Porém, no fungo *Histoplasma capsulatum* ela também foi encontrada na superfície celular. *C. neoformans* possui 4 genes de catalases, sendo duas prováveis enzimas da superfície de esporo, uma provável catalase localizada no peroxissomo e uma provável catalase citoplasmática. Entretanto, nenhuma catalase presente neste organismo tem sido descrita como enzima secretada e foi bem caracterizada. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é a caracterização da Catalase 2 de *C. neoformans* linhagem H99.

RESULTADOS

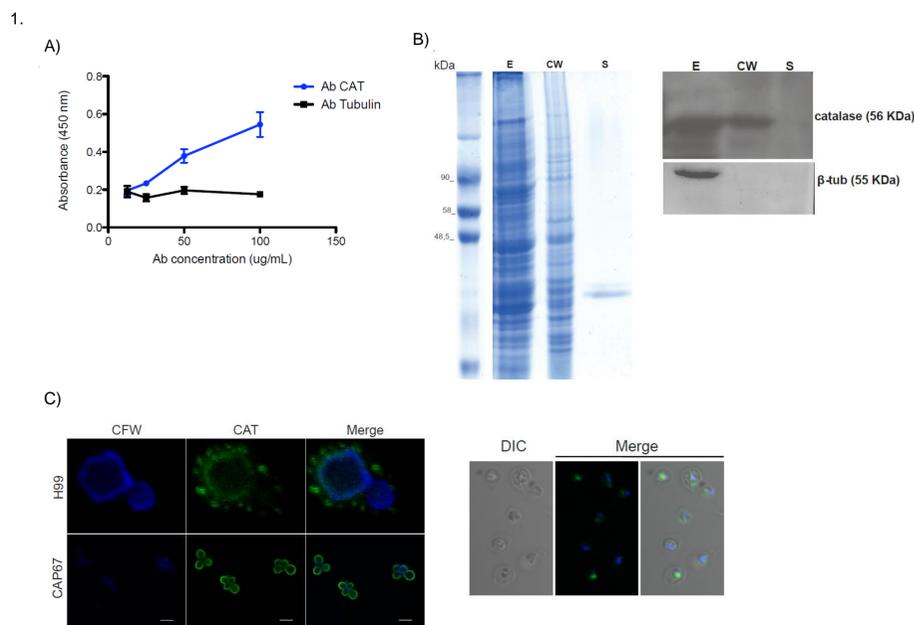


Figura 1 - Catalase 2 está localizada na superfície celular. A: ELISA de células intactas marcadas com o anticorpo policlonal anti-rCAT, mostrando que a proteína catalase 2 está na superfície celular. B: Painel da esquerda: Gel de Poliacrilamida contendo extrato total (E) corado com Comassie G; fração da parede celular (CW) e sobrenadante de cultivo (S). Painel da Direita: Western blot de extrato total (E), fração da parede celular (CW) e sobrenadante de cultivo (S) imunoreagido com o anticorpo policlonal anti-rCAT. C: Painel da esquerda: Imunofluorescência de células de *Cryptococcus neoformans* marcadas com anticorpo policlonal anti-rCAT (verde) e Calcofluor White (azul). Painel da direita: Imunofluorescência de células permeabilizadas de *Cryptococcus neoformans* marcadas com anticorpo policlonal anti-rCAT (verde) e DAPI (azul).

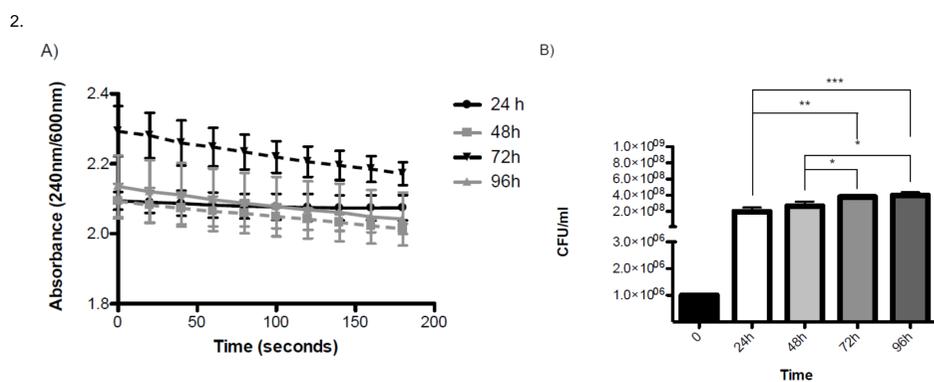


Figura 2 - Degradação de peróxido de hidrogênio por células intactas de *C. neoformans*. Figura A: Células de *C. neoformans* crescidas em meio YPD em diferentes tempos (24h, 48h, 72h e 96h) foram avaliadas quanto à sua atividade de degradação de peróxido de hidrogênio, mensurada pelo decaimento da absorvância em 240nm e normalizada pelo número de células (OD: 600nm). Figura B: Viabilidade celular de *C. neoformans* crescidas em YPD em diferentes tempos (24h, 48h, 72h e 96h).

CONCLUSÕES

A enzima Catalase 2 de *C. neoformans* localiza-se tanto no citoplasma quanto na parede celular. Após 72 horas de cultivo, houve um aumento na degradação de peróxido de hidrogênio, indicando que esta enzima pode ter atividade na superfície celular. Avaliando a atividade total das catalases de *C. neoformans*, podemos observar que a célula intacta possui atividade aumentada, bem como na fração de membrana, corroborando com os resultados anteriores. Em relação à regulação da catalase 2 em presença de peróxido de hidrogênio, verificou-se que não há um aumento da expressão desta enzima. Em contrapartida, a atividade total das catalases de *C. neoformans* aumenta na presença de peróxido de hidrogênio e não é regulada por fontes de carbono, divergindo do encontrado em outros fungos.

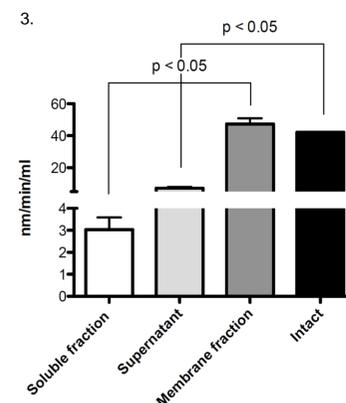


Figura 3 - Atividade específica de catalase de *C. neoformans*. Células de *C. neoformans* foram crescidas em YPD por 48 horas, o pellet e o sobrenadante separados por centrifugação. Soluble fraction: fração solúvel após sonicação; Supernatant: sobrenadante de cultivo; Membrane fraction: fração insolúvel após sonicação; Intact: células intactas. As quatro frações foram avaliadas quanto à atividade específica de catalase pelo kit Catalase Assay Kit (Cayman Chemical Company).

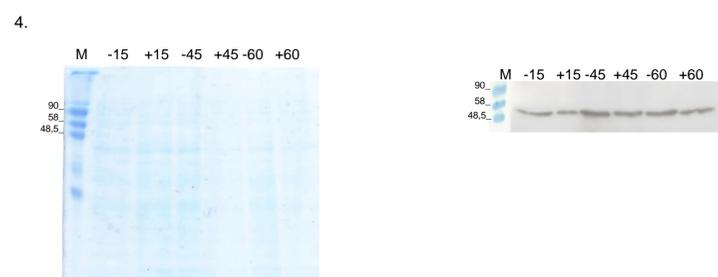


Figura 4 - A expressão de Catalase 2 não é alterada na presença de H_2O_2 . Gel de poliacrilamida contendo o extrato total proteico de células de *C. neoformans* incubadas com peróxido de hidrogênio por 15 min, 45 min ou 60 min (painel da esquerda) e Western blot das mesmas frações imunoreagido com o anticorpo policlonal anti-rCAT (painel da direita).

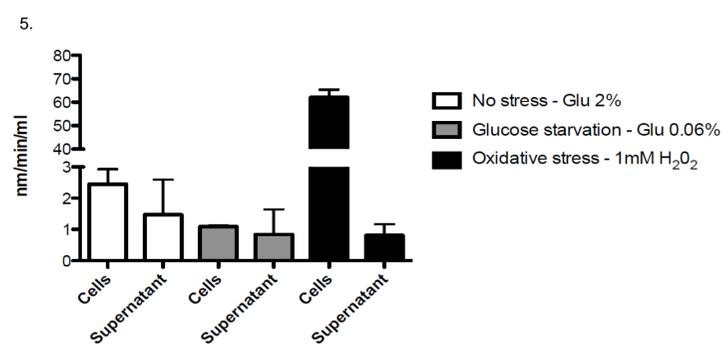


Figura 5 - Catalases de *C. neoformans* não são reguladas por fonte de carbono. Células de *C. neoformans* foram crescidas em presença de 2% de glicose, 0,06% de glicose ou 1mM de peróxido de hidrogênio. O sobrenadante de cultivo e as células lisadas com pérolas de vidro foram avaliadas quanto à atividade total de catalase pelo kit Catalase Assay Kit (Cayman Chemical Company).

PERSPECTIVAS

Avaliar a regulação da expressão da Catalase 2. Cultivar células de *C. neoformans* em meio de cultura possuindo diferentes fontes de carbono e avaliar por qRT-PCR o perfil de expressão desta enzima.