

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Camila Diehl

**PROSPECÇÃO DE NOVOS GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE
ZINCO EM *CRYPTOCOCCUS GATTII***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Porto Alegre

2016

Camila Diehl

**PROSPECÇÃO DE NOVOS GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE
ZINCO EM *CRYPTOCOCCUS GATTII***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de habilitação: Biotecnologia molecular

Orientador: Prof. Dr. Charley C. Staats

Porto Alegre

2016

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por tudo que conquistei até hoje. Por me ensinar a viver um dia de cada vez, buscando sempre aquilo que me faz feliz, sem hesitar.

À Sissa, que sempre esteve perto em todas as etapas da minha vida.

Ao Matheus, pelo companheirismo durante todos esses anos. Obrigada por dividir comigo tantos momentos importantes.

Ao meu orientador Charley C. Staats, sempre atencioso e disposto. Obrigada pela confiança em me aceitar no seu grupo de pesquisa.

Aos meus colegas de grupo Ane, Rafael, Alícia, Nicole e Fran, obrigada por todo auxílio durante a execução desse trabalho e pelas conversas reconfortantes.

Às professoras Livia e Marilene, pelos ensinamentos e confiança.

À todos os colegas dos laboratórios 220 e 217 do Centro de Biotecnologia, por toda contribuição durante esse período de convivência.

Aos meus colegas de curso, por partilhar comigo as dúvidas, medos e alegrias que a graduação nos proporcionou.

À UFRGS e aos professores, pelo ensino de excelência.

Às agências de fomento que possibilitaram a realização deste trabalho.

RESUMO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras basidiomicéticas, agentes etiológicos da criptococose, uma doença fatal que acomete seres humanos e outros mamíferos e se manifesta como pneumonia e/ou meningite. Infecções causadas por *Cryptococcus* são responsáveis por aproximadamente 1 milhão de casos de meningoencefalite por ano, resultando em cerca de 625.000 mortes. Durante o processo infeccioso a homeostase de metais nos patógenos deve ser finamente regulada, pois o excesso ou escassez de alguns destes metais pode produzir um ambiente tóxico para a célula. Metais como ferro, manganês e zinco são frequentemente incorporados em proteínas, como enzimas, e em fatores de transcrição, estando envolvidos em muitos processos biológicos importantes nas células. Trabalhos recentes, desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, evidenciam a importância do adequado metabolismo do metal zinco na virulência de *C. gattii*. O metabolismo do zinco é um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas antifúngicas, porque alguns agentes patogênicos fúngicos, como *C. gattii*, demonstram uma maior sensibilidade para a privação de zinco que de ferro. Assim, um melhor entendimento do metabolismo de zinco em fungos patogênicos pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O objetivo do presente trabalho foi identificar novos genes envolvidos no metabolismo de zinco em *C. gattii*. Para tanto, um *screening* realizado em uma biblioteca de mutantes insercionais aleatórios de *C. gattii* (linhagem R265), contendo cerca de 8.000 mutantes foi realizada e levou à identificação de um mutante (*ZRG*) com drástica redução de desenvolvimento em condições de privação de metais, obtidas com uso dos quelantes DTPA ou TPEN. Empregando técnicas de *chromosome walking*, identificamos o gene que se encontra interrompido nesse mutante selecionado – CNBG_1485, sendo então nomeado *ZRG1* (*zinc regulator gene 1*) pelo nosso grupo. A análise *in silico* deste gene revelou que o mesmo codifica uma proteína com restrição filogenética a Basidiomicetos, sem domínios conservados e com possível localização nuclear e/ou citoplasmática. Para a construção de mutantes nulos para o gene *ZRG1*, fragmentos de aproximadamente 1 kb das regiões 3' e 5' de flanking do gene foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *C. gattii* e purificadas em gel. Os fragmentos foram usados em uma reação de recombinação com o plasmídeo *pDNOR-NAT*. Os vetores obtidos foram clivados e utilizados para transformação de células de *C. gattii* através de bombardeamento. Após a seleção pela marca de resistência, o *screening* inicial dos mutantes nulos foi realizado por PCR de colônia.

Para confirmar a deleção, foi realizada por PCR a partir de DNA genômico e RT-PCR a partir do RNA extraído de células submetidas a condições de disponibilidade ou privação de metais, utilizando quelantes como DTPA e TPEN. Após todas essas etapas de confirmação, obtivemos dois mutantes que apresentaram deleção do gene *ZRGI*. Utilizando esses mutantes, realizamos ensaios de caracterização fenotípica que possam estar associadas à inativação do gene *ZRGI*, assim como alterações na virulência da linhagem.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC Flucitosina

AIDS/SIDA síndrome da imunodeficiência adquirida

cDNA DNA complementar

DEPC pirocarbonato de dietila

DNA ácido desoxirribonucleico

DTPA ácido dietilenotriaminopentaacético

EDTA ácido etilenodiaminotetracético

FBS soro fetal bovino

GalXM galactoxilomanana

GPI glicosilfosfatidilinositol

GXM glucuronoxilomanana

HIV vírus da imunodeficiência humana

IFN- γ interferon gama

kDa kilo Dalton

L-DOPA ácido (2S)-2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil)-propanóico

LB *Luria Broth*

MIC concentração inibitória mínima

NAT nourseotricina

OD densidade óptica

PAMPs padrões moleculares associados a patógenos

pb pares de bases

PBS tampão fosfato salino

PCR reação em cadeia da polimerase

PRRs receptores de reconhecimento de padrões

pH potencial hidrogeniônico

RNA ácido ribonucleico

RPM rotações por minuto

RT-PCR Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

RT-qPCR Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real associado a transcrição reversa

SDS dodecil sulfato de sódio

SNC Sistema Nervoso Central

Taq *Thermus aquaticus*

TNF- α fator de necrose tumoral alfa

TPEN N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino

YNB yeast nitrogen base

YPD *yeast-extract/peptone/dextrose*

WT wild type

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Filogenia de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	2
Figura 2 – Representação esquemática do processo de infecção por <i>Cryptococcus sp.</i>	3
Figura 3 – A disponibilidade de metal influencia a expressão do gene <i>ZRG1</i>	18
Figura 4 – Mapa do gene <i>ZRG1</i> e PCR <i>Double joint</i>	19
Figura 5 – Construção do vetor pDONOR-NAT_CNBG1485.....	20
Figura 6 – Confirmação da ausência de RNA mensageiro para o gene <i>ZRG1</i>	21
Figura 7 – Teste de crescimento a 30 °C e 37 °C.....	22
Figura 9 – Análise de sensibilidade a agentes indutores de estresse.....	23
Figura 10 – Análise de sensibilidade a Flucitosina 350 µ/mL.....	23
Figura 11 – Ensaio de concentração inibitória mínima (MIC) em meio YNB, suplementado com concentrações crescentes de TPEN, DTPA, ZnCl ₂ e MnSO ₄	25
Figura 12 – Ensaio de melanização.....	26
Figura 13 – Ensaio de formação de cápsula.....	27
Figura 14 – Ensaio de interação entre macrófagos de <i>Cryptococcus</i> – <i>GIEMSA</i>	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências e funções de <i>primers</i> utilizados.	16
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Cryptococcus gattii</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	1
1.2 Criptococose e estratégias terapêuticas.....	3
1.3 Fatores de virulência	5
1.3.1 Tolerância térmica	5
1.3.2 Cápsula polissacarídica	6
1.3.3 Produção de melanina	6
1.3.4 Atividades enzimáticas.....	6
1.4 Imunidade nutricional e homeostase de metais	7
1.4.1 Zinco.....	8
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Linhagens celulares, plasmídeos e sequencias de <i>primers</i>	10
3.2 Construção de vetores de inativação para o gene <i>ZRG1</i>	10
3.3 Construção de mutantes nulos para o gene <i>ZRG1</i>	11
3.4 Extração de DNA genômico de <i>C. gattii</i>	11
3.5 Extração de RNA.....	12
3.6 RT-PCR e <i>Real Time</i> RT-qPCR.....	13
3.7 Ensaios fenotípicos.....	13
3.7.1 Avaliação do crescimento a 30 °C e 37 °C e testes de sensibilidade a agentes estressores	13
3.7.2 Ensaio de concentração inibitória mínima (MIC)	14
3.7.3 Avaliação da síntese de melanina.....	14
3.7.4 Indução de cápsula.....	14
3.8 Ensaio de fagocitose em macrófagos murinos J774.A1	15

4. RESULTADOS	17
4.1 Análise <i>in silico</i> de <i>Zrg1</i> de <i>C. gattii</i>	17
4.2 Perfil de expressão do gene <i>ZRG1</i>	17
4.3 Construção do vetor	18
4.4 Geração de mutantes nulos.....	20
4.5 Análises de alterações fenotípicas no mutante do gene <i>ZRG1</i>	21
4.5.1 Desenvolvimento a 30 °C e 37 °C	21
4.5.2 Sensibilidade a agentes estressores	22
4.5.3 Sensibilidade à privação e disponibilidade de metais.....	22
4.5.4 Síntese de melanina.....	25
4.5.5 Indução de cápsula.....	26
4.6 Ensaio de interação entre macrófagos murinos J774.A1 e <i>C. gattii</i>	27
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS	36

1. Introdução

1.1 *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras basidiomicéticas, agentes etiológicos da criptococose, uma doença fatal que acomete seres humanos e outros mamíferos. Esta doença inicialmente se caracteriza por um quadro de pneumonia e pode evoluir para um quadro de meningoencefalite (Bahn, 2014). Infecções causadas por *Cryptococcus* spp. são responsáveis por aproximadamente 1 milhão de casos de meningoencefalite por ano em todo o mundo, resultando em cerca de 625 mil mortes (Park *et al.* 2009).

Essas duas leveduras afetam diferentes populações de indivíduos ocasionando no hospedeiro diferentes manifestações clínicas da doença. Enquanto *C. neoformans* infecta predominantemente indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com AIDS ou pacientes submetidos a terapias de imunossupressão, levando estes em sua grande maioria a desenvolver meningoencefalite, *C. gattii* é capaz de infectar, embora com incidência significativamente menor, hospedeiros imunocompetentes, sem doenças prévias discerníveis (Marr *et al.* 2012; Lizarazo *et al.* 2014; Wager *et al.* 2016).

Inicialmente o agente etiológico da criptococose foi considerado uma espécie homogênea (*C. neoformans*), classificada em 4 sorotipos (A ao D) de acordo com seus antígenos capsulares (Franzot *et al.* 1999). Atualmente, a partir da caracterização molecular, os sorotipos B e C passaram a ser classificados como uma nova espécie, denominada *C. gattii*. Apesar de apresentarem cerca de 85-90% de similaridade genética, ambas diferem em suas características moleculares, epidemiológicas, distribuição geográfica e nichos ecológicos (Cogliati, 2013).

Uma classificação por tipo molecular dividiu as duas espécies em 4 diferentes tipos moleculares. *C. gattii* engloba os sorotipos B e C, sendo que isolados do sorotipo B podem ser classificados nos tipos moleculares VGI e VGII, os quais são associados à infecção em indivíduos imunocompetentes (Byrnes *et al.* 2011). Já o sorotipo C, que infecta principalmente pacientes imunocomprometidos, consiste nos tipos moleculares VGIII e VGIV (Lin e Heitman, 2006). O genótipo VGII pode ainda ser dividido nos subgenótipos VGIIa, VGIIb e VGIIc, que variam em seus níveis de virulência. VGIIa e VGIIc são considerados

hipervirulentos em relação a VGIIb (Byrnes *et al.* 2010). Já *C. neoformans*, apresenta distribuição mundial e está dividido nos sorotipos A (*C. neoformans* var. *grubii*), D (*C. neoformans* var. *neoformans*) e o híbrido AD. O sorotipo A é constituído pelos tipos moleculares VNI, VNII e VNB, o sorotipo D pelo tipo molecular VNIV e o sorotipo híbrido AD é constituído pelo tipo molecular VNIII (Lin e Heitman, 2006) (Figura 1). No Brasil, existe a prevalência dos sorotipos VNI de *C. neoformans* e VGII de *C. gattii* (Cogliati, 2013).

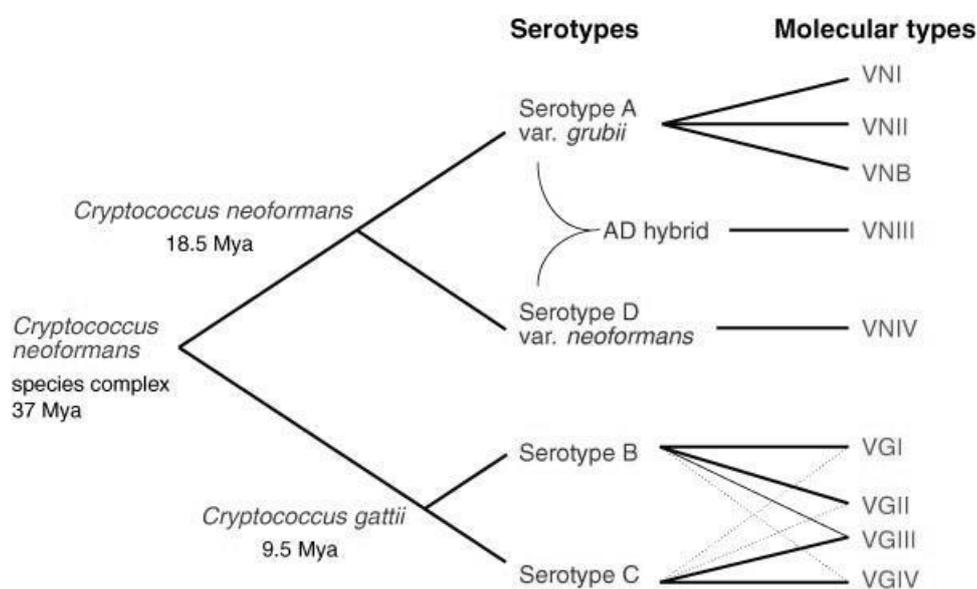


Figura 1. Filogenia de *C. neoformans* e *C. gattii*. O complexo de espécies *Cryptococcus* possui duas subespécies. A espécie *C. neoformans* é dividida em dois sorotipos, A e D, enquanto a espécie *C. gattii*, em B e C. Adaptado de Lin e Heitman, 2006.

Na natureza, esses organismos podem ser encontrados em locais distintos. *C. neoformans* é comumente associado com excrementos de aves e solo, tendo uma distribuição global, enquanto *C. gattii* é tradicionalmente um organismo de regiões tropicais e subtropicais, associado com certas espécies de árvores, como *Eucalyptus spp.* (Figura 2) (Liu *et al.* 2012). Porém, um surto de infecção por *C. gattii* que ocorreu na Ilha de Vancouver, no Canadá, demonstrou a expansão de área geográfica desse patógeno também para as regiões de clima temperado (MacDougall *et al.* 2007).

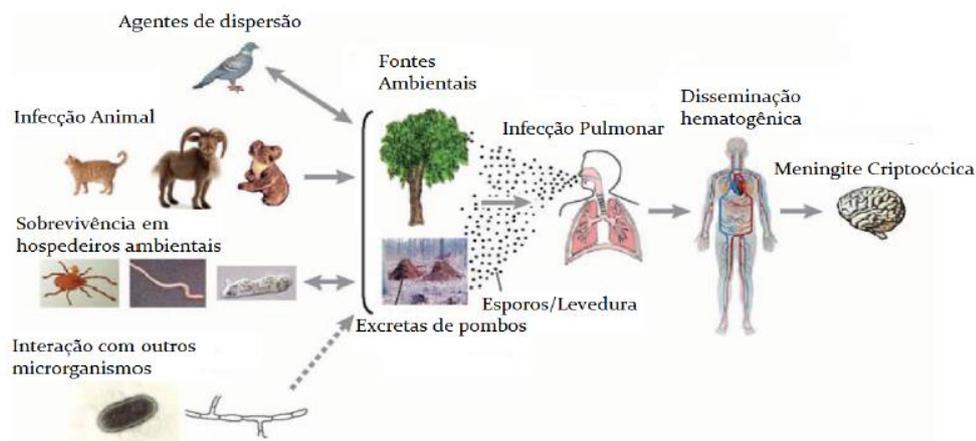


Figura 2. Representação esquemática do processo de infecção por *Cryptococcus sp.* A infecção se inicia pela inalação de esporos ou leveduras dessecadas do ambiente, sendo *C. gattii* normalmente associado a fontes ambientais, como árvores e solo e *C. neoformans* a excretas de pombos. Após a inalação, as leveduras se depositam no pulmão, havendo tropismo acentuado de *C. neoformans* para o SNC. Adaptado de Lin e Heitman, 2006.

1.2 Criptococose e estratégias terapêuticas

A criptococose afeta cerca de 1 milhão de pessoas no mundo a cada ano. A África Subsaariana concentra a maioria dos registros, com um número estimado de 720 mil casos de meningite criptocócica anuais, mas a América Latina é a terceira região do mundo em número de casos registrados, aproximadamente 54 mil casos de meningite criptocócica por ano (Park *et al.* 2009).

A meningite criptocócica é a infecção fúngica mais comum do sistema nervoso central e a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes com AIDS (Cogliati, 2013). O aumento do uso de terapias de imunossupressão, seja em casos de pacientes transplantados ou submetidos à quimioterapia, e a disseminação da AIDS, contribuem para a problemática da infecção causada por *Cryptococcus spp.* De acordo com o último relatório, publicado em dezembro de 2010 pelo *Joint United Organization Program on HIV/AIDS and the World Health Organization*, estima-se que 34 milhões de pessoas no mundo são portadoras do vírus HIV, sendo que 2,7 milhões de pessoas são infectadas por ano e 1,8 milhões morrem devido a complicações da AIDS (Cogliati, 2013). No Brasil, atualmente, a meningite criptocócica tornou-se uma complicação comum da infecção causada por HIV, assim como em outros países latino-americanos. A criptococose representa a principal causa de meningite

oportunista em pacientes imunocomprometidos, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 55% dos casos (Góngora Rivera *et al.* 2000; Leimann *et al.* 2009). No Rio Grande do Sul, dados coletados de 2007 a 2013 demonstraram que aproximadamente 20% dos pacientes notificados com meningite criptocócica evoluíram a óbito devido a complicações da doença (Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, 2013).

A infecção do hospedeiro se inicia pela inalação de células fúngicas do ambiente, que se depositam nos alvéolos pulmonares (Figura 2) (Lin e Heitman 2006; Velagapudi *et al.* 2009). Estas células podem colonizar o trato respiratório sem causar doença sintomática (Maziarz e Perfect, 2016), que pode permanecer latente por um longo período (Srikanta *et al.* 2014). A quantidade de células que entram em contato com o pulmão após a inalação é muito pequena, pois a grande maioria é eliminada por mecanismos de defesa do organismo. Análises sorológicas indicam que a infecção criptocócica em humanos é prevalente, mas a doença é rara (Goldman *et al.* 2001). Os poucos esporos ou leveduras que conseguem evadir essa defesa inicial, desencadeiam uma resposta imune pró-inflamatória, caracterizada pela produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (INF- γ), ativando a resposta mediada por células fagocíticas (Cheng *et al.* 2009). A disseminação pelo organismo do hospedeiro pode se dar quando células fagocíticas, como os macrófagos alveolares, falham em eliminar o patógeno, e acabam por servir como nichos para a proliferação da levedura. Desta forma, é estabelecido o primeiro contato entre as células fúngicas e o sistema imune do hospedeiro (Gibson e Johnston, 2014). Dentro de macrófagos, as células do patógeno conseguem atingir a corrente sanguínea e se disseminar pelo organismo, chegando a órgãos como o cérebro (Liu *et al.* 2012). Em modelo murino de infecção, observa-se que alguns genótipos de *C. gattii* tendem a ficar mais restrito a infecções pulmonares, enquanto *C. neoformans* apresenta grande tropismo para o SNC (Ngamskulrunroj *et al.* 2012).

A Anfotericina B tem sido o principal agente terapêutico da criptococose desde o final da década de 1960 (Sarosi *et al.* 1969). Embora às vezes usado sozinho, tornou-se comum no início dos anos 80 a combinação com Flucitosina (5-FC). Na América Latina, o tratamento mais frequente é a monoterapia com Anfotericina B, como 5-FC é normalmente indisponível (Vidal *et al.* 2013). A estratégia de tratamento para a criptococose pode variar dependendo das diferentes categorias de grupos de risco: pacientes infectados pelo HIV, receptores de transplante de órgãos, pacientes não infectados pelo HIV e não transplantados (Kwon-Chung *et al.* 2014). Contudo, esses fármacos apresentam alta toxicidade, desencadeando uma série de

efeitos colaterais no paciente. Além disso, é comum a aquisição de mecanismos de resistência por parte das células fúngicas (Posteraro *et al.* 2003; Sionov *et al.* 2009; Sionov *et al.* 2010).

1.3 Fatores de virulência

Micro-organismos patogênicos vivem em uma relação complexa com o hospedeiro infectado, pois o patógeno deve ser capaz de reconhecer o ambiente gerado pelo organismo do hospedeiro, respondendo de forma adequada com alterações celulares adaptativas. Esta resposta inclui muitas vezes a indução de fenótipos específicos, que tornam o micro-organismo capaz a sobreviver e proliferar nesse novo ambiente. Essa resposta adaptativa permite a muitos organismos patogênicos evadir o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro e estabelecer com sucesso uma infecção (Alspaugh, 2015). As células de *Cryptococcus* spp. possuem certos fatores de virulência bem caracterizados. Esses fatores apresentam grande importância no contexto infectivo, propiciando a evolução da criptococose de uma infecção pulmonar inicial para os quadros mais graves da doença.

1.3.1 Tolerância térmica

Uma condição essencial para o estabelecimento da infecção em hospedeiros humanos é a tolerância de crescimento na temperatura de 37 °C que as células de *Cryptococcus* spp. apresentam. Essa tolerância por si só não torna um micro-organismo patogênico, mas é um pré-requisito obrigatório para que a infecção em hospedeiros humanos ocorra de maneira efetiva (McCusker *et al.* 1994). Um dos genes relacionados a esta característica é o *CNA1*, o qual codifica uma proteína calcineurina dependente de Ca²⁺, a qual é ativada em condições de mudança de temperatura, promovendo a desfosforilação de proteínas necessárias para o desenvolvimento à 37 °C (Kraus *et al.* 2005). Outro gene descrito como responsável por essa condição é o gene *URA4*, que codifica a enzima Ura4, responsável pela conversão de carbamoil-L-aspartato fosfato em dihidroorotato na rota de síntese da pirimidina (Gontijo *et al.* 2014). Uma série de outros genes e fatores de transcrição participam da regulação de termotolerância, a grande maioria deles realizando modificações na estrutura do RNA da célula fúngica (Alspaugh, 2015).

1.3.2 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é uma das características mais marcantes de *Cryptococcus* spp. Esta estrutura é induzida em resposta a vários estados associados com o hospedeiro, tais como a pH neutro / alcalino, níveis elevados de CO₂ e privação de ferro (Granger *et al.* 1985; Vartivarian *et al.* 1993). Essa cápsula é formada principalmente pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM), assim como por manoproteínas (Coelho *et al.* 2014; Bielska e May, 2016). A cápsula apresenta atividade imunomodulatória, podendo variar seu tamanho conforme o ambiente em que se encontra a célula fúngica (Rivera *et al.* 1998). É capaz de alterar a migração de células do sistema imune do hospedeiro, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, inativar o sistema complemento e proteger a célula fúngica dos danos causados por espécies reativas de oxigênio (O'Meara e Alspaugh, 2012). Além disso, a cápsula também age como uma barreira física e antifagocítica, por impedir o reconhecimento de receptores. No meio ambiente, a cápsula tem papel contra a atividade fagocítica de amebas e contra predadores naturais como os nematódeos, além de proteger a célula fúngica da desidratação (O'Meara e Alspaugh, 2012).

1.3.3 Produção de melanina

Cryptococcus spp. são capazes de depositar camadas espessas do pigmento melanina na parede de suas células, protegendo-as contra a oxidação (Liu *et al.* 2012) e inibindo a ação de macrófagos (Eisenman e Casadevall, 2012). As células melanizadas são mais resistentes aos efeitos de determinados antifúngicos, como a anfotericina B e caspofungina, e a microbicidas oxidantes. Sendo assim, a melanização influencia no processo de infecção uma vez que o pigmento reduz a resposta imunológica do hospedeiro e a atividade terapêutica de alguns medicamentos (Nosanchuk e Casadevall, 2006). No meio ambiente, a melanina protege a levedura da luz ultravioleta e de agentes oxidantes.

1.3.4 Atividades enzimáticas

Cryptococcus spp. produzem uma série de enzimas com função de degradação, algumas delas determinantes da virulência das células fúngicas. As enzimas urease (Cox *et al.* 2000, Osterholzer *et al.* 2009; Singh *et al.* 2013) e fosfolipase B (Cox *et al.* 2001, Ganendren

et al. 2006,) são enzimas de degradação que têm um papel importante na virulência criptocócica. As funções destas enzimas promovem a sobrevivência no ambiente intracelular de células fagocíticas (Wright *et al.* 2007), a hidrólise das membranas das células hospedeiras (Chen *et al.* 1997), a imunomodulação (Noverr *et al.* 2003, Osterholzer *et al.* 2009) e o aumento da disseminação fúngica do pulmão para o cérebro (Cox *et al.* 2000, Noverr *et al.* 2003, Wright *et al.* 2007, Shi *et al.* 2010). A falta destas enzimas resulta na redução da virulência.

1.4 Imunidade nutricional e homeostase de metais

Uma grande variedade de estratégias é usada pelo sistema imune para controlar a proliferação de agentes infecciosos. Para prevenir infecções com organismos patogênicos, seres humanos, assim como outros mamíferos e potencialmente outros animais, podem restringir o acesso desses organismos aos metais essenciais e outros nutrientes, como glicose, em um processo designado imunidade nutricional (Cassat e Skaar, 2012). O ferro e o cobre são os metais mais bem estudados. Ambos são relevantes para a virulência e alterações em sua homeostase afeta múltiplos aspectos da biologia de *Cryptococcus* spp. que são clinicamente relevantes, incluindo a eficácia de fármacos antifúngicos. Os efeitos da limitação do ferro em *C. neoformans* são conhecidos desde o início dos anos 90, sendo uma de suas consequências mais característica é o aumento da formação de cápsula (Vartivarian *et al.* 1993). Defeitos na homeostase de cobre ocasionam redução da formação de cápsula e da melanização e maior suscetibilidade a fagocitose em *C. neoformans* (Chun e Madhani, 2010).

Em outros casos, células do sistema imune do hospedeiro, como os macrófagos, ao fagocitarem o patógeno, aumentam a concentração desses metais no ambiente intracelular, com o intuito de tornar o ambiente tóxico (White *et al.* 2009). Metais como ferro, cobre, zinco, dentre outros, são frequentemente incorporados em proteínas, como enzimas, e em fatores de transcrição, estando envolvidos em muitos processos biológicos importantes nas células, sendo necessários para a sobrevivência de todos os organismos vivos (Hood e Skaar, 2012), portanto sua homeostase deve ser finamente regulada, pois a atividade catalítica mediada por metais pode produzir um ambiente tóxico para a célula

(Hood e Skaar, 2012).

1.4.1 Zinco

O zinco é considerado o segundo metal mais importante presente nas células por participar da atividade catalítica e na estabilidade estrutural demais de 300 enzimas em humanos (Auld, 2001). Em mamíferos, a deficiência de zinco, mesmo moderada, pode ocasionar graves alterações no sistema imune e doenças como anemia, por exemplo.

Trabalhos recentes, desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, evidenciam a importância do adequado metabolismo do metal zinco na virulência de *C. gattii*. A ausência de *ZAPI*, um regulador transcricional sensível a zinco que é responsável pela homeostase desse metal, afeta a virulência de *C. gattii*. *Zap1* regula a expressão de transportadores de zinco e de várias proteínas de ligação de zinco, propiciando o adequado aporte de zinco nas células e evitando, indiretamente, o aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (Schneider *et al.* 2012). Outro exemplo da importância da regulação correta da homeostase de zinco diz respeito ao gene *ZIP1* que codifica uma proteína transportadora de zinco. Demostramos que mutantes nulos para esse gene, perdem a capacidade de se desenvolver em meios sem disponibilidade de zinco e acumulam maiores níveis de espécies reativas intracelulares. Adicionalmente, este gene participa na virulência de *C. gattii* (Schneider *et al.* 2015).

Nesse contexto, o metabolismo do zinco é um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas antifúngicas, porque alguns agentes patogênicos fúngicos, como *C. gattii*, demonstram uma maior sensibilidade para a privação de zinco que de ferro. Portanto, identificar e caracterizar novos genes que apresentem resposta ao zinco e outros metais essenciais em *C. gattii* constitui uma abordagem importante no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização funcional do gene *ZRG1* em *C. gattii* e avaliar a sua participação do metabolismo de zinco e na expressão de fatores de virulência.

2.2 Objetivos específicos

- a) Construção de vetores para inativação do gene *ZRG1*;
- b) Construção e seleção de um mutante de *C. gattii* nulo para o gene *ZRG1* obtido através da técnica de bombardeamento;
- c) Confirmação da inativação do gene;
- d) Análise do padrão de expressão do gene *ZRG1*;
- e) Estudo da relação do gene *ZRG1* com a homeostase de metais como o zinco em *C. gattii*;
- f) Caracterização da influência do gene *ZRG1* no desenvolvimento e na expressão de fatores de virulência de *C. gattii*.

3. Materiais e métodos

3.1 Linhagens celulares, plasmídeos e sequências de *primers*

Para realização deste estudo, a linhagem de *C. gattii* R265, proveniente do surto infeccioso que ocorreu em Vancouver no Canadá, no ano de 1999, foi utilizada como tipo selvagem. Esta linhagem foi cedida ao nosso grupo de pesquisa pelo Dr. Wieland Meyer e utilizada para construção de mutantes nulos para o gene CNBG_1485 (*ZRGI*). Todas as linhagens foram cultivadas em meio YPD - 2% glicose, 2% peptona e 1% extrato de levedura e 1,5% (m/v) ágar, quando necessário) e/ou em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (*Difco*). Para mimetizar as condições de privação de metais, utilizaram-se os agentes quelantes TPEN e DTPA em concentrações que variaram dependendo do ensaio. Neste estudo, utilizamos o plasmídeo pDONRNAT, que possui marca de seleção para noursectricina (NAT) em *Cryptococcus sp.* (McDade e Cox, 2001). Para a propagação do vetor, células de *E. coli* TOP10F foram utilizadas. Seu cultivo foi realizado em meio *Luria Broth* (LB), acrescido de 1,5% (m/v) de ágar, quando necessário. Placas de YPD sólido suplementadas com 50 µg/mL de NAT foram utilizadas para a seleção dos mutantes nulos. Os *primers* utilizados em todas as etapas desse estudo estão listados na Tabela 1.

3.2 Construção de vetores de inativação para o gene *ZRGI*

Para a construção de mutantes nulos para o gene *ZRGI*, fragmentos de aproximadamente 1 kb das regiões 5' e 3' de flaqueamento do gene *ZRGI* foram amplificadas por PCR, utilizando os pares de *primers* CNBG1485-5F/CNBG1485-5R e CNBG1485-3F/CNBG1485-3R (Tabela 1), respectivamente. Os amplicons foram purificados após eletroforese em gel de agarose usando um sistema comercial (*PureLink™ Quick Gel Extraction*; Invitrogen). Os fragmentos purificados foram unidos através da técnica de PCR "double-joint" (Yu *et al.* 2004), utilizando como molde 1 ng dos produtos de PCR purificados e o par de *primers* CNBG1485-5R/CNBG1485-3F. O produto dessa reação foi purificado após eletroforese em gel de agarose usando um sistema comercial (*PureLink™ Quick Gel Extraction*; Invitrogen) e utilizado para a recombinação com o plasmídeo pDONOR-NAT (Schenider *et al.*, 2012) com a enzima *Gateway® BP Clonase™ II*. Para esta reação foram adicionados 100 ng do vetor linearizado e 100 ng do fragmento de aproximadamente 2 kb em

um volume final de 10 μL . O vetor recombinante gerado foi transformado em células de *E. coli* TOP10F. Após a seleção das células recombinantes, foi realizada a purificação do vetor utilizando sistema comercial (*PureLink™ Hi Pure Plasmid Midiprep Kit* - Invitrogen). Para confirmar a construção do vetor recombinante pDONOR-NAT_CNBG1485 foram realizadas clivagens com as enzimas de restrição PvuII (10 U/ μL) (Promega) e EcoRV (10 U/ μL) (Promega). Para ambas as reações utilizamos 0,5 μL da enzima de restrição, 2 μL de tampão 10 X, 0,2 μL de BSA 1 mg/mL (quando necessária a adição), 1 μL de pDONOR-NAT_CNBG1485 (1 μg) e H_2O *milliQ* para um volume final de reação de 20 μL . As reações foram incubadas por 1 h 30 min a 37 °C e inativadas por 15 min a 65 °C. As reações de restrição foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

3.3 Construção de mutantes nulos para o gene *ZRGI* em *C. gattii*

Os vetores obtidos foram linearizados com a enzima I-SceI e utilizados para transformação de células de *C. gattii* via biobalística, de acordo com o protocolo descrito por Toffaletti *et al.* 1993 e selecionadas em meio YPD sólido contendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de noursetricina (NAT).

3.4 Extração de DNA genômico de *C. gattii*

Para a extração de DNA genômico dos transformantes, cada linhagem foi incubada a 30 °C e 200 RPM em 20 mL de meio YPD líquido. Após 24 h, 10 mL do cultivo foi centrifugado e as células foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato salino estéril (PBS 1x - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 e 1,8 mM KH_2PO_4) e submetidas à liofilização por um período entre 48 e 72 h. O *pellet* celular liofilizado foi macerado 3 vezes com nitrogênio líquido e adicionado à 4 mL do tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA; 200 mM NaCl; 2% Triton X-100; 1% SDS). A suspensão foi agitada e 2 mL de clorofórmio e 1 mL de fenol foram adicionados a mesma. Após agitação seguida de centrifugação a 8.000 RPM por 20 min, a fase aquosa foi dividida (500 μL) em tubos *de* microcentrífuga de 1,5 mL. À cada alíquota da fase aquosa, o mesmo volume de clorofórmio foi adicionado, seguido de centrifugação a velocidade máxima por 15 min. A fase aquosa foi novamente coletada e precipitada *overnight* com 1 V de isopropanol e 0,2 M de NaCl a - 20 °C. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 13.000 RPM, o

sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi lavado com 200 μ L de etanol 70% gelado. Após a retirada do etanol e secagem, o DNA foi suspenso em água *milliQ* e tratado com 50 μ g/mL de RNase por 30 min a 37 °C.

3.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração de RNA de células de *C. gattii*, estas foram cultivadas por 18 h a 30 °C em 50 ml de YPD líquido. O cultivo foi centrifugado a 9.000 x *g* por 10 min e as células foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato salino estéril (PBS - 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ e 1,8 mM KH₂PO₄). Após essa etapa, as células foram suspensas em PBS e a O.D. 600 nm foi mensurada. Uma concentração de células relativa a 1 O.D. (10⁷ células/mL) foi inoculada em 25 mL de meio YNB em 3 diferentes condições: somente meio YNB, meio YNB acrescido de 10 μ M de TPEN e meio YNB acrescido de 100 μ M de DTPA. O cultivo foi mantido por 2 h a 30 °C e 200 RPM, após esse período, o cultivo foi centrifugado a 9.000 x *g* por 10 min e congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e macerado. Uma alíquota do macerado foi transferida para um tubo contendo 1 mL do reagente TRIzol (*Life Technologies*). Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 12.000 x *g* por 10 min a 10 °C. O sobrenadante da centrifugação foi retirado e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, 0,2 mL de clorofórmio foi adicionado ao sobrenadante e ambos foram misturados por inversão do tubo por 15 segundos. Após 3 minutos de incubação em temperatura ambiente, a amostra foi submetida à centrifugação a 12.000 x *g* por 15 min, a 10 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol a temperatura ambiente por 30 min. Após este período, a amostra foi centrifugada a 12.000 x *g* por 10 min a 10 °C e posteriormente lavada com etanol 70 %. A amostra foi ressuspensa em água previamente tratada com DEPC. Após quantificação, aproximadamente 1 μ g de RNA foi tratado com DNase 1 U/ μ L (*Thermo Scientific*) por 30 min a 37 °C e inativada conforme instruções do fabricante. A eficácia do tratamento foi verificada por PCR utilizando os primers Act (Tabela 1). Para síntese de cDNA, foi utilizada a enzima transcriptase reversa (RT) Improm II (Promega) e 0,2 μ g de RNA previamente tratado com DNase, conforme instruções do fabricante. A reação foi incubada a 42 °C por 1 h.

3.6 RT-PCR e *Real Time* RT-qPCR

Para os experimentos de RT-PCR, o cDNA de cada linhagem foi utilizado como molde para uma reação de PCR utilizando a enzima *Taq DNA Polymerase recombinant* 5 U/uL (Invitrogen) em um volume final de 25 μ L, sendo utilizado 0,2 μ L de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 2,5 μ L do tampão apropriado, 2,5 μ L dNTP (10 pmol/ μ L), 1 μ L MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de cada *primer* (CNBG4185R e CNBG1485F - 10 pmol/ μ L) e H₂O *milliQ* para completar o volume adequado. A reação foi realizada em condições cíclicas de temperatura que se iniciam com 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 60 s e finalizando com 72 °C por 5 min.

Para as análises de *Real Time* RT-qPCR foi utilizado o sistema *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) em condições cíclicas de temperatura, iniciando com 94 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 60 °C por 10 s e 72 °C por 15 s e 60 °C por 35 s. para a reação foi utilizado o kit *SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix* (Thermo Fisher), com a adição de 0,4 μ L de ROX, 0,2 μ L de cada *primer* (5 pmol/ μ L) (CNBG4185R e CNBG1485F), 18,2 μ L do mix (diluição 1x) e 1 μ L do cDNA como molde para um volume final de 20 μ L. Todos os experimentos foram realizados a partir de três cultivos independentes e cada amostra de cDNA foi analisada em triplicada. Para esse ensaio, utilizamos como parâmetro de comparação com a linhagem R265 *WT* uma linhagem de *C. gattii* R265 mutante para o gene *ZIP1*. Esse gene codifica uma proteína transportadora de alta afinidade a zinco e sua deleção exerce influencia direta sobre a virulência de *C. gattii* (Schneider *et al.* 2015). A análise da *melting curve* foi realizada no final da reação para confirmar a presença de um único produto de PCR. Actina foi utilizada como gene normalizador e a expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). A análise estatística foi realizada por *One-way* ANOVA, seguida de teste de Tukey.

3.7 Ensaios fenotípicos

3.7.1 Avaliação do crescimento a 30 °C e 37 °C e testes de sensibilidade a agentes estressores

As linhagens R265, *ZRG1A.99* e *ZRG1A.219* foram cultivados em meio YPD a 30 °C e 200 RPM. Após 18 h, as células foram lavadas em PBS 1x estéril e a densidade celular foi

ajustada para 10^7 células/mL. As suspensões celulares foram diluídas em série até a concentração de 10^2 células/mL. Nos ensaios de avaliação do crescimento celular, 5 μ L de cada suspensão foram pipetados em meio YPD sólido e incubados a 30 e 37 °C por 48 h. Para avaliar a sensibilidade a agentes estressores, 5 μ L de cada suspensão foram pipetados em meio YPD sólido suplementado com 1,5 M de NaCl, 2,5 M de Sorbitol, 0,05% de SDS e 3,5 mM H₂O₂, e 350 μ g/mL, 0,6 μ g/mL e 18 μ g/mL dos fármacos Flucitosina, Fluconazol e Anfotericina B, respectivamente. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h e fotografadas.

3.7.2 Ensaio de concentração inibitória mínima (MIC)

Para avaliar o grau de sensibilidade de crescimento das linhagens mutantes, realizamos um ensaio de concentração inibitória mínima (MIC). Para esse ensaio, as linhagens R265, *ZRG1A.99* e *ZRG1A.219* foram cultivados em meio YPD a 30 °C e 200 RPM. Após 18 h, as células foram lavadas em PBS 1x estéril, a densidade celular foi ajustada para 10^5 células/mL e inoculadas em meio YNB acrescido de concentrações decrescentes dos quelantes TPEN e DTPA, e dos metais zinco e manganês em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h e após esse período foi mensurada a densidade celular em 600 nm, utilizando a plataforma SpectraMax i3x Multi-Mode Detection.

3.7.3 Avaliação da síntese de melanina

As linhagens R265, *ZRG1A.99* e *ZRG1A.219* foram cultivados em meio YPD a 30 °C e 200 RPM. Após 18 h, as células foram lavadas em PBS 1x estéril e a densidade celular foi ajustada para 10^7 células/mL. As suspensões celulares foram diluídas em série até a concentração de 10^2 células/mL e 5 μ L de cada suspensão foram pipetadas em meio mínimo sólido (1 g/L asparagina, 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O, 3 g/L KH₂PO₄, e 3 μ M tiamina) acrescido de 1 mM de dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), conforme descrito por Kmetzsch *et al.* 2011. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 h e fotografadas.

3.7.4 Indução de cápsula

A fim de mensurar a cápsula de R265 *WT* e os mutantes *ZRG1A.99* e *ZRG1A.219*, estes foram cultivados em 20 mL de YPD líquido a 30 °C e 200 RPM. Após 18 h, uma

alíquota de 1,5 mL do cultivo foi centrifugado, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1x estéril. Um volume referente à densidade celular de 10^7 células/mL foi adicionado a poços de placa de 24 poços contendo meio RPMI (*Gibco*TM) completo. Após 72 h de incubação a 37 °C e 5 % CO₂, as células foram centrifugadas a 6.000 RPM por 2 min, lavadas 3 vezes com PBS estéril e fixadas com paraformaldeído 4 % a 37 °C por 30 min e guardadas na geladeira. Para a visualização, as células foram coradas com tinta nanquim e analisadas no microscópio *Axioskop 40* (*Zeiss*, Alemanha). As imagens foram capturadas pela câmera *Axiocam MRC* (*Zeiss*, Alemanha) e processadas pelo *software analySIS* (*Soft Image System*).

3.8 Ensaio de interação entre macrófagos murinos J774.A1 e *C. gattii*

Os ensaios de interação foram realizados para avaliar a suscetibilidade das linhagens R265 *WT* e os mutantes *ZRG1A.99* e *ZRG1A.219* à ação antifúngica de fagócitos. Para este experimento foi utilizada a linhagem J774.A1 de macrófagos murinos, as quais foram aderidas em uma densidade de 10^7 células em placa de 96 poços contendo DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS). Após 18 h de incubação a 37 °C e 5 % CO₂, o meio foi substituído por suspensões de células fúngicas contendo 10^6 células/mL, previamente opsonizadas com o anticorpo anti-GXM 18B7, amplamente utilizado em ensaios de fagocitose (Kozel, 1993). As placas foram incubadas por 2 h. Após o período de incubação, as células não fagocitadas foram removidas através de lavagem com PBS três vezes. O sistema foi fixado com metanol 100% por 30 min, sendo posteriormente corado com o reagente *GIEMSA* (*Laborclin*) por 20 min e analisado no microscópio *Axioskop 40* (*Zeiss*, Alemanha). As imagens foram capturadas pela câmera *Axiocam MRC* (*Zeiss*, Alemanha) e processadas pelo *software analySIS* (*Soft Image System*). A contagem das células de macrófagos e de *Cryptococcus* fagocitadas foi realizada com auxílio do *software ImageJ* (NIH, <http://rbs.info.nih.gov/ij/>). Para expressar os resultados, foi realizada a razão entre o número de células fúngicas fagocitadas pelo número de células de macrófagos presentes no campo aleatoriamente escolhido. Foram mensuradas 250 células de macrófagos para cada condição de interação e os resultados foram analisados por *Student t-test*.

Tabela 1. Sequências e funções de *primers* utilizados.

Nome	Sequência	Função
ActF ActR	5'-CGGTATCGTCACAACTGG-3' 5'-GGAGCCTCGGTAAGAAC-3'	Análise dos níveis de transcritos de <i>ACT1</i> por <i>Real Time</i> RT-qPCR.
CNBG1485F CNBG1485R	F: 5'-ACCCTTCATTTCGCACCTAAC-3' R: 5'-GGGACGAGGTATCGTTTGTATG-3'	Análise dos níveis de transcritos de <i>ZRG1</i> por <i>Real Time</i> RT-qPCR.
CNBG1485-5F CNBG1485-5R	F: 5'-AAAATAGGGATAACAGGGTAATGGTCGACAATTCACGCTCAA-3' R: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCCGCAACTGACTAATGAA-3'	Amplificam 1 kb da região 5' do gene CNBG1485
CNBG1485-3F CNBG1485-3R	F: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGAGCAGAATGAACAAGGAAGGA-3' R: 5'-AAAAATTACCCTGTTATCCCTAGTGAGCTCATATAGCACCTTGTC-3'	Amplificam 1 kb da região 3' do gene CNBG1485

4. Resultados

4.1 Análise *in silico* de *Zrg1* de *C. gattii*

Dados anteriores de nosso grupo revelaram, a partir de um *screening* realizado em uma biblioteca de mutantes insercionais aleatórios de *C. gattii*, que um mutante com inserção de T-DNA no gene CNBG_1485 apresentou sensibilidade de crescimento em condições de privação de metais, ocasionado pela adição dos quelantes de zinco TPEN ou DTPA. Este gene codifica uma proteína de 1143 aa, com massa molecular estimada em aproximadamente 124 kDa. De acordo com o servidor TMHMM (Krogh *et al.* 2001, disponível em <http://cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), não há domínios transmembrana. Adicionalmente, análises no servidor Cell-PLoc (Chou e Shen, 2008, disponível em <http://csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc>) revelaram que a localização predita desta proteína é o citoplasma ou o núcleo. Análises de ortologia empregando o banco de dados OrthoMCL (Li *et al.* 2003, disponível em <http://orthomcl.org>) identificou que *ZRG1* de *C. gatti* possui apenas ortólogos em espécies do gênero *Cryptococcus*.

4.2 Perfil de expressão do gene *ZRG1*

Para analisar o padrão de expressão do gene *ZRG1* e se esse é influenciado pela disponibilidade ou privação de metais, foi realizado o cultivo da linhagem R265 mutante para o gene *ZIP1* (*ZIP1Δ*) e *WT* nas condições controle (meio YNB) e na condição de privação de metais, utilizando quelante DTPA e TPEN. As células foram congeladas e liofilizadas para posterior extração de RNA total e síntese de cDNA, como descrito nos materiais e métodos. Foi realizada a análise de *Real Time* PCR, utilizado os *primers* CNBG1485R e CNBG1485F (Tabela 1).

Observamos um aumento significativo dos níveis relativos de transcritos para o gene *ZRG1* na linhagem R265 *WT* quando esta foi cultivada na presença dos quelantes DTPA e TPEN, em relação à condição controle (somente meio YNB) (Figura 3), o que indica que a expressão do gene *ZRG1* é, possivelmente, influenciada pelos níveis de metais disponíveis no ambiente intra e extracelular. Quando analisamos os níveis relativos de transcritos na linhagem *ZIP1Δ*, observamos que essa apresenta altos níveis de transcritos quando cultivada na condição de disponibilidade de metais (meio YNB), e que ocorre uma redução, porém não

significativa neste caso, quando a linhagem é cultivada na condição de privação de metais (Figura 3).

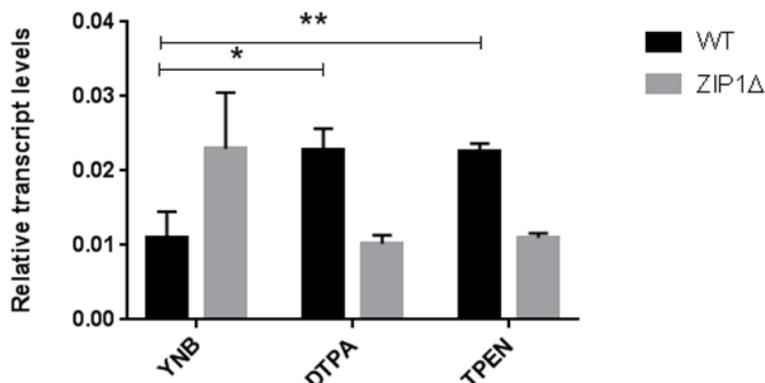


Figura 3. A disponibilidade de metal influencia a expressão do gene *ZRG1*. A expressão do gene *ZRG1* foi avaliada por PCR tempo real a partir do RNA extraído dos cultivos de *C. gattii* na condição controle (meio YNB) e condição de privação de metal (com adição dos quelantes DTPA e TPEN). A quantidade relativa de cada transcrito foi normalizada de acordo com os valores de *Ct* obtidos para os transcritos referentes ao gene normalizador Actina. Os resultados representam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata biológica e triplicata técnica. Análise estatística realizada por *Student t test*. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

4.3 Construção do vetor

Para a construção do vetor utilizado para geração de mutantes nulos para o gene CNBG_1485, as regiões 5' e 3' que flanqueiam o gene de interesse foram amplificadas separadamente (Figura 4A), utilizando como molde o DNA genômico de *C. gattii* R265. Após a purificação dos fragmentos amplificados, estes foram unidos de PCR *Double Joint*, resultando em um único *amplicon* de aproximadamente 2 kb (Figura 4B), o qual foi recombinado com plasmídeo pDNOR-NAT.

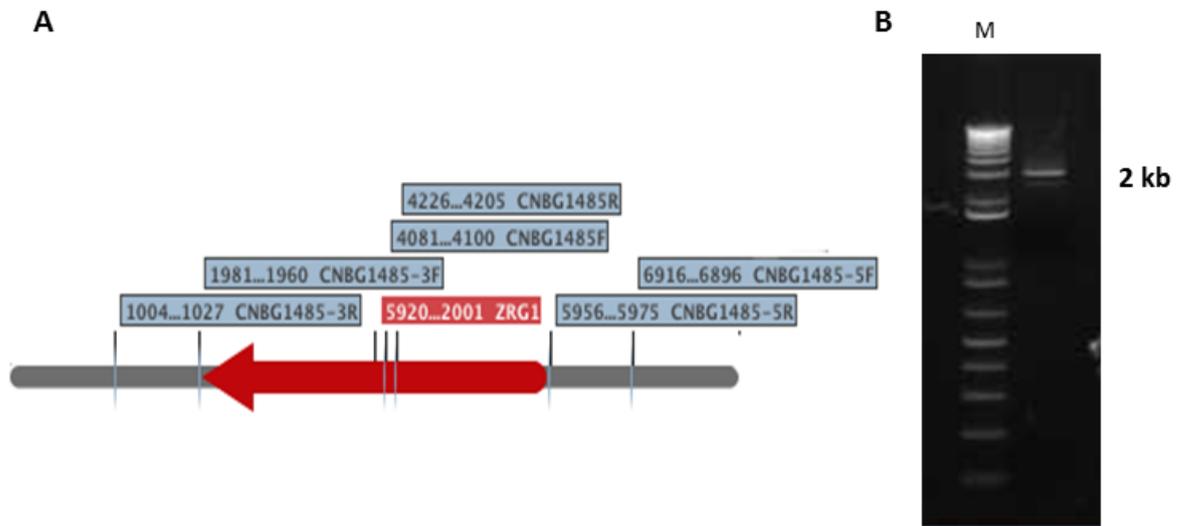


Figura 4. Mapa do gene ZRG1 e PCR *Double joint* (A) Representação esquemática do gene ZRG1. (B) Fragmento de aproximadamente 2 kb gerado a partir de PCR *Double joint*, utilizado na recombinação com o vetor escolhido. M, marcador de tamanho molecular 1 kb plus DNA *ladder*.

A reação de recombinação entre o *amplicon* e o plasmídeo resultou em um vetor recombinante de 6.521 pb, o qual foi transformado através de choque térmico em células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10F. Realizamos o *screening* de colônias positivas através de PCR de colônia e selecionamos três das que se apresentaram positivas para extração plasmidial e clivagem com as enzimas de restrição PvuII, gerando dois fragmentos (3.684 pb e 2.837 pb) e com a enzima EcoRV, gerando um fragmento (6.521 pb) (Figura 5A). Das três colônias escolhidas, isolamos novamente o plasmídeo recombinante da colônia 5. Para assegurar que a construção estava correta, realizamos uma nova clivagem com PvuII e com EcoRV (Figura 5B).

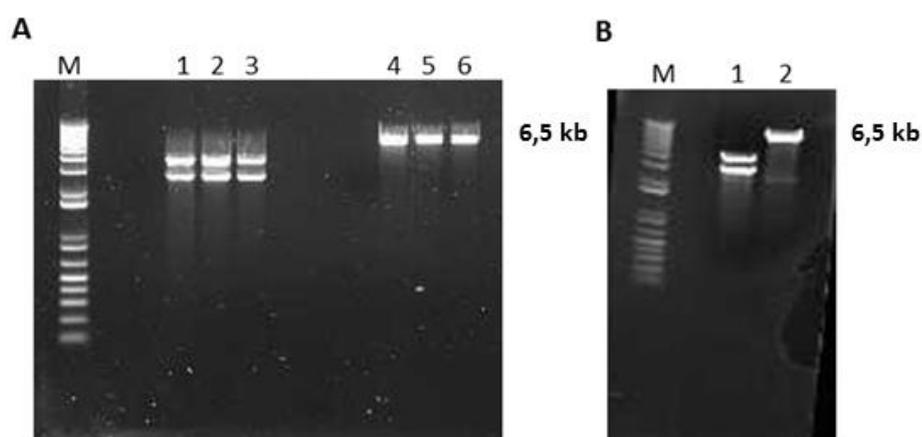


Figura 5. Construção do vetor pDNOR-NAT_CNBG1485. (A) Análise de restrição dos plasmídeos extraídos de três colônias de *E. coli* selecionadas dentre todas as transformantes com PvuII (1, 2 e 3) e EcoRV (4, 5 e 6). Todas confirmaram a transformação, gerando fragmentos de tamanho esperado. (B) Análise de restrição do plasmídeo extraído da colônia 5 com PvuII (1) e EcoRV (2). A construção foi confirmada pela geração de fragmentos de tamanho esperado. M, marcador de tamanho molecular 1 kb plus DNA ladder.

4.4 Geração de mutantes nulos

O vetor pDNOR-NAT_CNBG1485 foi utilizado para transformar células da linhagem R265 de *C. gatti* pelo método de biobalística, resultando em colônias transformantes capazes de crescer em meio seletivo, contendo 50 µg/mL de nourseotricina. O *screening* de transformantes foi realizado por PCR de colônia com os *primers* CNBG1485R e CNBG1485F (Tabela 1), que amplificam um fragmento de aproximadamente 200 pb na região interna do gene *ZRG1*. A partir do *screening* inicial de aproximadamente 600 colônias por PCR, selecionamos possíveis transformantes que não apresentaram amplificação para a próxima etapa de confirmação. Realizamos o cultivo desses transformantes e da linhagem R265 selvagem (*WT*) em meio YNB em três diferentes condições: somente meio YNB, meio YNB acrescido de 10 µM de TPEN e meio YNB acrescido de 100 µM de DTPA. O cultivo foi mantido por 2 h a 30 °C e 200 RPM. Após esse período, procedemos com o protocolo de extração de RNA total e síntese de cDNA. Este cDNA foi utilizado em uma reação de PCR com os *primers* CNBG1485R e CNBG1485F, para realizar a confirmação da ausência de RNA mensageiro para o gene *ZRG1* nas linhagens transformantes.

Através da análise em gel desse resultado, obtivemos a confirmação da geração de dois mutantes nulos para nosso gene alvo, nomeados como *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* (Figura 6)

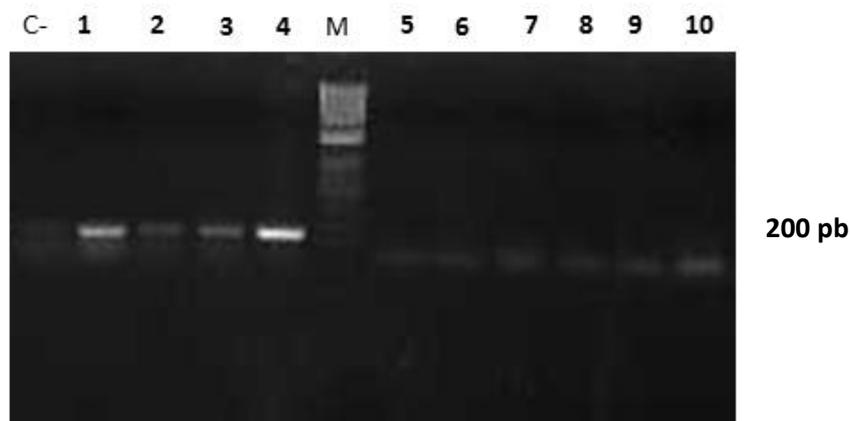


Figura 6. Confirmação da ausência de RNA mensageiro para o gene *ZRG1*. Análise em gel do PCR utilizando os *primers* CNBG1485R e CNBG1485F, gerando um fragmento de aproximadamente 200 pb. C-, controle negativo da reação. 1, DNA genômico de R265 *WT*. 2, cDNA R265 *WT* cultivado na presença de DTPA. 3, cDNA R265 *WT* cultivado na presença de TPEN. 4, cDNA R265 *WT* cultivado em YNB. 5, cDNA R265 *ZRG1Δ.99* cultivado na presença de DTPA. 6, cDNA R265 *ZRG1Δ.99* cultivado na presença de TPEN. 7, cDNA R265 *ZRG1Δ.99* cultivado em YNB. 8, cDNA R265 *ZRG1Δ.219* cultivado na presença de DTPA. 9, cDNA R265 *ZRG1Δ.219* cultivado na presença de TPEN. 10, cDNA R265 *ZRG1Δ.219* cultivado em YNB. M, marcador de tamanho molecular 1 kb plus DNA *ladder*.

4.5 Análises de alterações fenotípicas no mutante do gene *ZRG1*

4.5.1 Desenvolvimento a 30 °C e 37 °C

Para verificar a capacidade de desenvolvimento dos mutantes a 30 °C e 37 °C, realizamos um teste em gotas com diluições seriadas de 10^7 a 10^2 células/mL (Figura 7). Os resultados não demonstram diferença de crescimento entre os mutantes e *C. gattii ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* e a linhagem R265 *WT* nas temperaturas avaliadas, o que demonstra que a ausência gene *ZRG1* não interfere na capacidade de desenvolvimento da linhagem nas condições avaliadas.

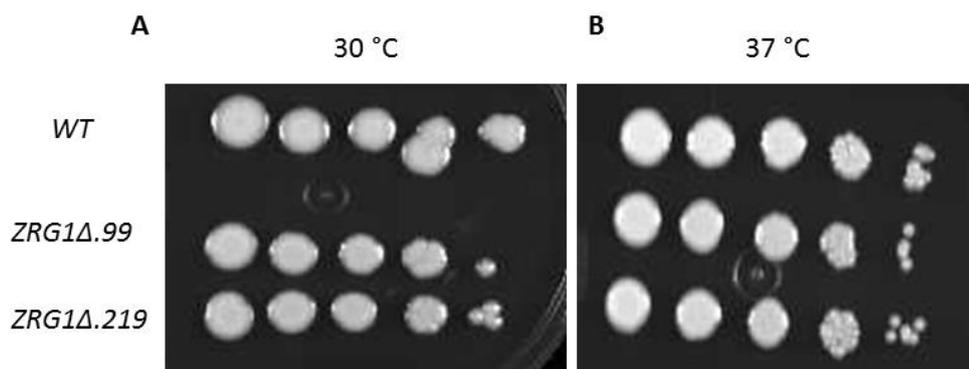


Figura 7. Teste de crescimento a 30 °C e 37 °C. Avaliação da sensibilidade de crescimento dos mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* em relação a linhagem R265 *WT*. Foi utilizado 5 μ L de diluições seriadas de 10^7 a 10^2 células/mL. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C (A) e 37 °C (B) durante 48 h.

4.5.2 Sensibilidade a agentes estressores

Avaliamos a sensibilidade das linhagens a condições de estresse ocasionadas por diferentes agentes. Para tanto, utilizamos meios contendo 1,5 M de NaCl, 2,5 M de Sorbitol e 3,5 mM H_2O_2 . Também foram avaliadas as sensibilidades a 350 μ g/mL, 0,6 μ g/mL e 18 μ g/mL dos fármacos Flucitosina, Fluconazol e Anfotericina B, respectivamente. As placas foram fotografadas após 48 h de incubação a 30 °C.

Não foram detectadas diferenças de crescimento entre mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* e R265 *WT* na maioria das condições de estresse testadas (Figura 8), exceto para o fármaco Flucitocina, que induziu uma redução significativa do crescimento celular dos mutantes em relação a linhagem R265 *WT* na concentração testada (Figura 9). Nesse experimento, utilizamos como base de comparação o mutante *ZRG* isolado da nossa biblioteca. Esse resultado nos demonstrou que o gene *ZRG1* pode ter influencia no mecanismo de defesa da célula contra a ação do fármaco Flucitocina, mas que provavelmente não está envolvido em mecanismos de defesa relacionados a outros tipos de estresse.

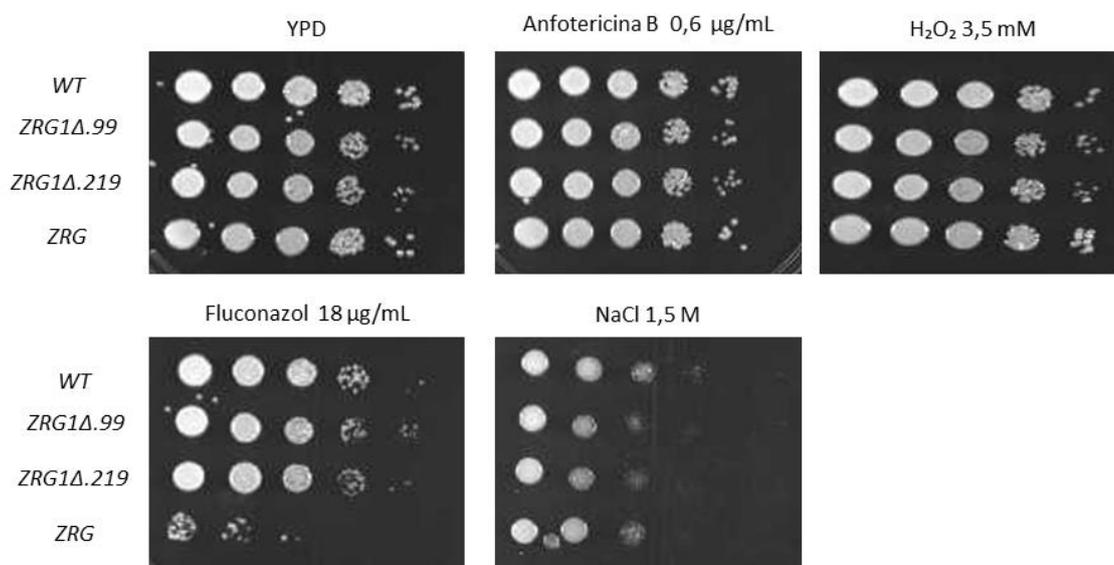


Figura 8. Análise de sensibilidade a agentes indutores de estresse. Foram utilizados 5 µL de diluições seriadas de 10⁷ a 10² células/mL para realização de teste em gotas. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante 48 h. Não foi observada diferença de crescimento entre mutantes e R265 WT nas condições de concentração testadas.

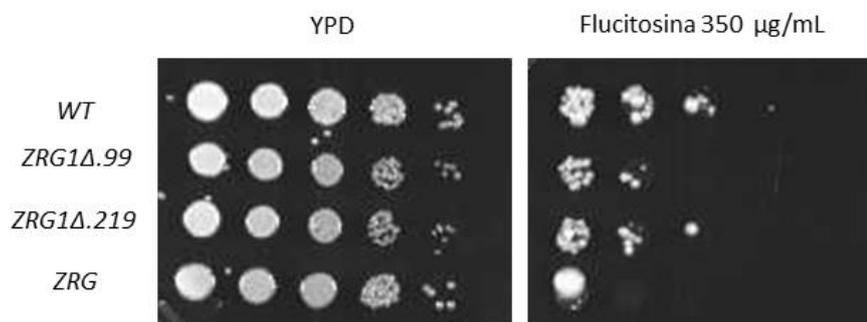


Figura 9. Análise de sensibilidade a Flucitosina (350 µg/mL). Foi utilizado 5 µL de diluições seriadas de 10⁷ a 10² células/mL para realização de teste em gotas. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante 48 h. Foi observada diferença de crescimento entre mutantes e R265 WT na condição de concentração testada.

4.5.3 Sensibilidade à privação e disponibilidade de metais

Nós avaliamos a sensibilidade das linhagens mutantes a condições de privação e excesso de metais, a fim de determinar se a ausência do gene *ZRG1* exerce influencia na

capacidade de desenvolvimento nessas condições. Através do ensaio de concentração inibitória mínima (MIC), onde uma concentração de 10^5 células foi inoculada em meio YNB acrescido de concentração específicas dos quelantes DTPA e TPEN (Figura 10A e B) e dos metais zinco e manganês (Figura 10C e D) em placas de 96 poços e, após o período de 24 h em estufa a 30 °C foi mensurado o crescimento relativo na O.D. 600 nm.

Observamos que o crescimento relativo das linhagens mutantes nulos *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* sofrem uma redução significativa de crescimento quando cultivadas em meio com a adição dos quelantes DTPA e TPEN, demonstrando que a ausência do gene *ZRG1* tem influência no crescimento das células de *C. gatti* em condições de indisponibilidade de metais (Figura 10A e B). Já quando nós adicionamos zinco ao meio de cultivo, esse se mostrou tóxico para as células das linhagens mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219*, reduzindo seus crescimentos relativos em relação a linhagem R265 *WT*, mesmo em concentrações baixas (Figura 10C). A adição de manganês propiciou o crescimento relativo das linhagens mutantes semelhante à linhagem R265 *WT* em concentrações baixas do metal, mas se mostrou tóxico para as linhagens mutantes, reduzindo seu crescimento, em concentrações superiores a 2 mM (Figura 10D).

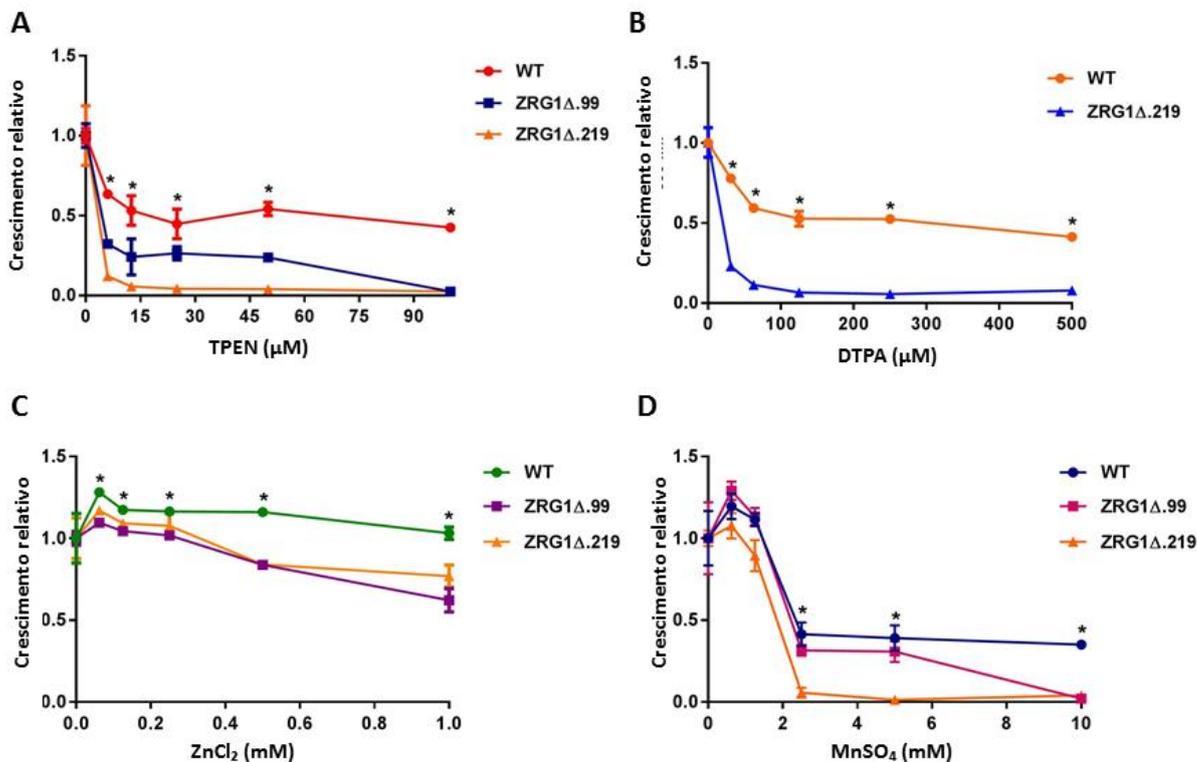


Figura 10. Ensaio de concentração inibitória mínima (MIC) em meio YNB, suplementado com concentrações crescentes de TPEN, DTPA, ZnCl₂ e MnSO₄. Uma concentração de 10⁵ células foi inoculada em meio YNB acrescido de concentração específicas dos quelantes TPEN (A) e DTPA (B), e dos metais zinco (C) e manganês (D) em placas de 96 poços e, após o período de 24 h em estufa a 30 °C foi mensurada o crescimento relativo na O.D. 600 nm. Todas as condições testadas apresentaram redução significativa do crescimento relativo das células dos mutantes nulos *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* em relação a linhagem R265 *WT*. Os resultados representam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata técnica. Análise estatística realizada por *Student t test*. **p*≤0,05.

4.5.4 Síntese de melanina

A indução da síntese de melanina, outro importante fator de virulência de *C. gattii*, foi realizada em meio mínimo sólido acrescido de L-DOPA, com a adição de 0,1% e 1% de glicose. Realizamos um teste em gotas com diluições seriadas de 10⁷ a 10² células/mL. As placas foram fotografadas após 72 h de incubação. Não observamos diferenças visuais de

melanização entre as linhagens mutantes e a linhagem R265 *WT* nas condições testadas, demonstrando que a ausência do gene *ZRG1* também não exerceu influência nessa característica de virulência de *C. gattii* (Figura 11A e B).

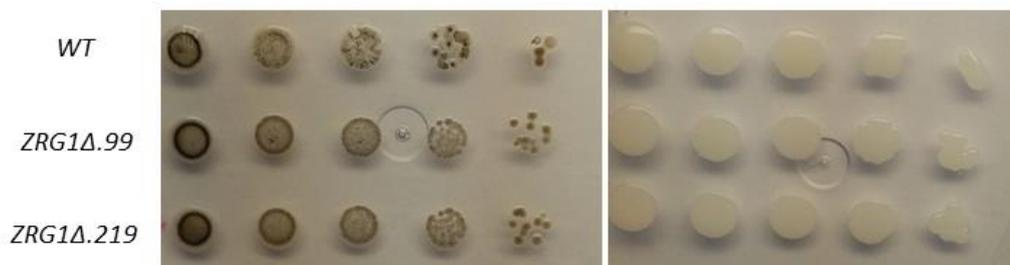


Figura 11. Ensaio de melanização. A capacidade de síntese de melanina foi avaliada em ensaio em meio mínimo L-DOPA. Não foi observada diferença de melanização entre as linhagens mutantes e a linhagem R265 *WT* em meio mínimo sem glicose (esquerda) e em meio mínimo com a adição de 1% de glicose (direita).

4.5.5 Indução de cápsula

A fim de avaliar a capacidade das linhagens de produzirem cápsula, foi realizada uma indução em meio RPMI e atmosfera de 5% CO₂. Após 72 h de indução, as células foram fixadas em paraformaldeído 4 % e coradas com tinta nanquim para visualização em microscópio óptico (Figura 12A).

Os resultados demonstraram que todas as células foram capazes de induzir cápsula polissacarídica e não foi observada uma diminuição qualitativa entre os mutantes e a linhagem R265 *WT*.

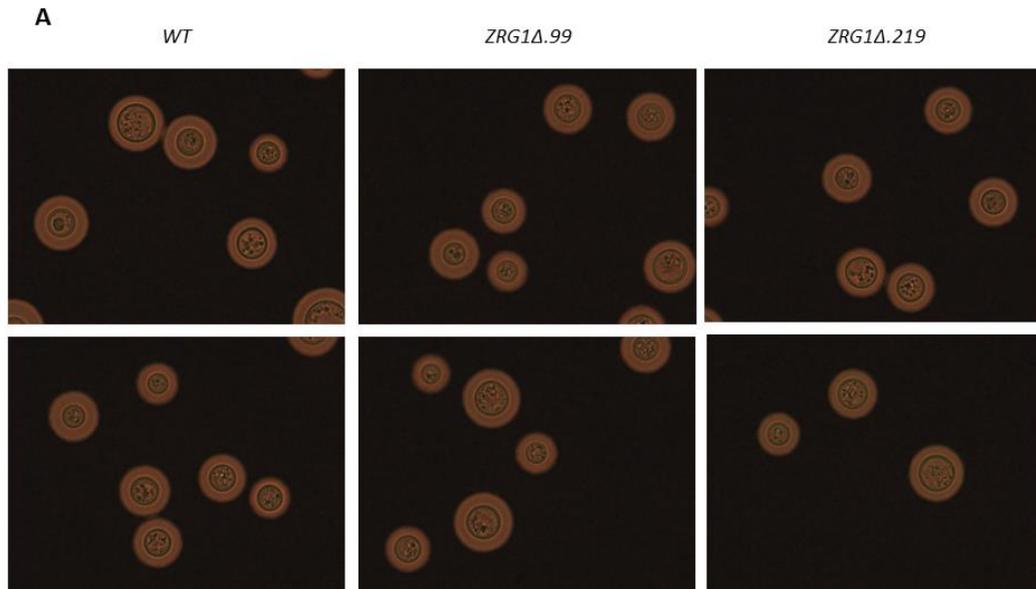
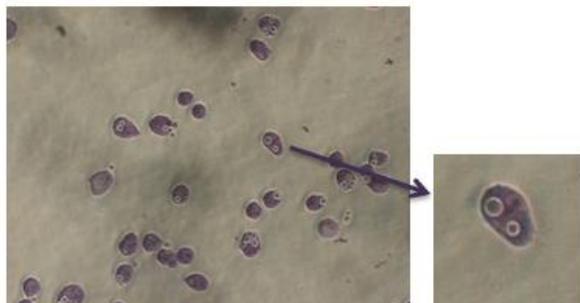


Figura 12. Ensaio de formação de cápsula. A capacidade de formação de cápsula foi avaliada no ensaio de indução, a partir do cultivo das células na presença de CO₂ e em meio mínimo RPMI, por 72h. Não foi observada diminuição do tamanho da cápsula entre os mutantes e a linhagem R265 WT.

4.6 Ensaio de interação entre macrófagos murinos J774.A1 e *C. gattii*

Para o ensaio de fagocitose, nós realizamos a interação de 10⁷ células de macrófagos murinos linhagem J774.1 previamente ativadas com PMA com *C. gattii* em uma multiplicidade de infecção de 10:1 por um período de 2 h. Após esse período, o sistema foi fixado com metanol, corado com a reagente *GIEMSA* e avaliados por microscopia (Figura 13A). Observamos uma redução significativa na fagocitose das linhagens mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* em relação a linhagem R265 WT, no tempo de interação testado, sugerindo que a deleção de *ZRG1* possa induzir alguma modificação na linhagem que impeça que essa seja reconhecida pelos macrófagos (Figura 13B).

A



B

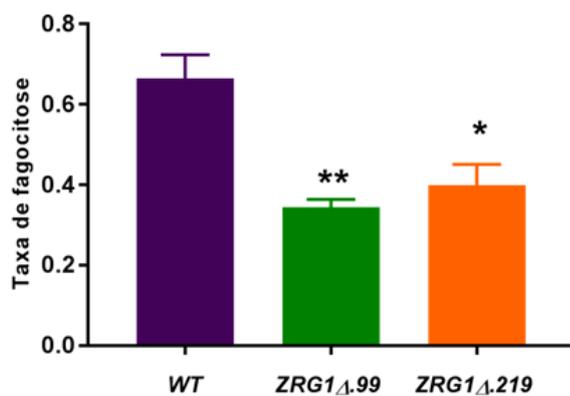


Figura 13. Ensaio de fagocitose entre macrófagos e *Cryptococcus*. (A) Imagem representativa de células de macrófagos contendo leveduras fagocitadas. (B) Os resultados representam a média mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata técnica. Análise estatística realizada por *Student t test*, $**p \leq 0,001$ $*p \leq 0,01$.

5. Discussão

Muito embora *C. gattii* seja responsável por uma percentagem baixa dos casos de criptococose registrados, essa levedura apresenta grande importância no meio médico, pois, diferente de *C. neoformans*, *C. gattii* possui a capacidade de infectar também hospedeiros imunocompetentes. No entanto, a ideia de que a *C. gattii* é um agente patogênico primário ainda é questionada, pois alguns estudos indicam que apesar de não apresentarem histórico de doença prévia discernível, pacientes infectados por *C. gattii* podem apresentar certos tipos de predisposição à infecção por patógenos oportunistas (Saijo *et al.*, 2014; Kwon-Chung e Saijo, 2015).

O Rio Grande do Sul é o segundo Estado do Brasil com maior incidência de casos de infecção pelas leveduras patogênicas do gênero *Cryptococcus*, principalmente devido ao alto número de pacientes também infectados pelo vírus HIV (SES-CEVS-TABNET). A aquisição de mecanismos de resistência contribui para a problemática da doença, porque atualmente existem poucas drogas antifúngicas realmente eficientes na eliminação de patógenos como *Cryptococcus*. Além disso, o uso prolongado desses fármacos torna-se tóxico para o paciente, causando uma série de efeitos colaterais que dificultam o tratamento (Banerjee *et al.* 2014).

Nesse contexto, identificar novos alvos para desenvolvimento de drogas antifúngicas eficientes e com mínimos efeitos colaterais é de extrema necessidade. Contudo, para que isso ocorra, ainda é preciso um entendimento mais profundo de certos mecanismos associados ao desenvolvimento dessas leveduras.

O metabolismo de metais se mostra um potencial alvo terapêutico para tratar infecções causadas por agentes patogênicos, como *Cryptococcus*, pois todos os organismos necessitam de uma homeostase de metais finamente regulada para se desenvolverem. Demostramos que em *C. gattii* o adequado metabolismo do metal zinco exerce influência direta sobre sua virulência. A ausência da proteína que atua como transportador de alta afinidade a esse metal torna a linhagem R265 menos virulenta e ocasiona um aumento nos níveis intracelulares de ROS. Essas evidências, recentemente coletadas pelo nosso grupo de pesquisa, demonstram a importância do entendimento do metabolismo de zinco em *C. gattii*, ainda pouco estudado (Schneider *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2015).

Inicialmente, através da utilização de uma biblioteca de mutantes insercionais de *C. gatti* linhagem R265, identificamos um mutante que sofria drástica redução de seu crescimento quando cultivado na condição de privação de metais. Utilizando técnicas de

mapeamento cromossômico e sequenciamento, encontramos o gene alvo desse estudo. O gene CNBG_1485 (*ZRG1*) codifica uma proteína com restrição filogenética a classe de Basidiomicetos, sem domínios conservados descritos na literatura e com possível localização nuclear e/ou citoplasmática. Acreditamos que essa sensibilidade apresentada à privação de metais nesse mutante pudesse ter associação com a ausência de expressão do gene, podendo acarretar diferenças significativas na virulência da linhagem.

Até o presente momento, não existiam dados sobre a associação deste gene com o desenvolvimento e virulência de *C. gattii* na literatura, nem sobre sua relação com a homeostase de zinco ou outros metais nessa linhagem. Deste modo, nesse estudo nós realizamos a caracterização da funcionalidade desse gene e sua relação com a homeostase de metais em *C. gattii*, a partir da construção de um mutante nulo para o mesmo.

A deleção do gene *ZRG1* deu origem a duas linhagens mutantes nulos denominadas *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219*. Para a confirmação de todos os mutantes construídos, realizamos as técnicas de RT-PCR, submetendo os possíveis transformantes selecionados através de PCR de colônia ao cultivo em condições de disponibilidade e privação de metais, para posterior extração RNA total. O objetivo dessa técnica foi avaliar qualitativamente a presença de RNA mensageiro para o gene *ZRG1*, induzindo condições onde os níveis de expressão desse gene poderiam se mostrar elevados (condição de privação de metais). Os resultados avaliados em gel confirmaram que os mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* não possuíam RNA mensageiro para o gene de interesse, caracterizado na figura como ausência de cDNA.

Realizamos uma análise, através de *Real time* PCR, do perfil de expressão do gene *ZRG1* na condição de disponibilidade e privação de metais, a fim de confirmar se a expressão desse gene é influenciada por essas condições. Para essa análise, utilizamos a linhagem R265 *WT* e uma linhagem de *C. gattii* mutante para o gene *ZIP1* (*ZIP1Δ*), responsável por codificar uma proteína transportadora de alta afinidade a zinco. Utilizamos essa linhagem, previamente construída pelo nosso grupo de pesquisa (Schneider *et al.*, 2015), para comparar se o perfil de expressão do nosso gene alvo poderia sofrer influência da ausência de um gene sabidamente envolvido na homeostase de metais em *C. gattii*. Os níveis relativos de transcrito para o gene *ZRG1* sofreram um aumento significativo quando a linhagem R265 *WT* foi submetida à privação de metais, tanto pela utilização do agente quelante DTPA, capaz de quelar metais extracelulares de uma maneira geral, quanto do agente quelante TPEN, que possui uma afinidade maior por quelar zinco extra e intracelular. Um comportamento muito semelhante também foi observado para os níveis relativos de transcritos do gene *ZIP1* na linhagem R265

WT quando submetida às mesmas condições de privação de metais (Schneider *et al.* 2015). Isso demonstra que a expressão do gene *ZRGI*, assim como do gene *ZIP1*, esta regulada pelos níveis de metais presentes na célula e no ambiente, respondendo de forma direta a alterações na sua homeostase. Quando avaliamos os níveis de transcritos na linhagem *ZIP1Δ*, estes mostraram um comportamento oposto ao observado na linhagem R265 *WT*, com uma redução, porém não significativa, dos níveis de transcritos quando essa linhagem foi submetida à condição de privação de metais. Isso demonstrou que a ausência de *ZIP1* causou nas células de *C. gattii* uma completa desregulação na expressão de outros genes que podem ter envolvimento com a homeostase de metais na célula.

Alterar o perfil de expressão de genes é um comportamento muito comum em patógenos durante o processo de infecção (Gibson e Johnston, 2014). Nesse contexto, células do sistema imune do hospedeiro utilizam estratégias de limitação da disponibilidade de nutrientes e metais essenciais para conter a disseminação do patógeno (Cassat e Skaar, 2012). Esse por sua vez, pode aumentar a expressão de genes que codificam proteínas de transporte e modificar os mecanismos de captação desses nutrientes e metais, como tentativa de evadir as defesas do organismo (Hood e Skaar, 2012). O aumento dos níveis de transcritos para nosso gene alvo pode sugerir que este codifica uma proteína de transporte de metais em *C. gattii*, regulado diretamente ou sob-regulação de um fator de transcrição que responde a variação dos níveis de metais extra e/ou intracelulares.

Passamos então para as análises fenotípicas das nossas linhagens mutantes, a fim de determinar se a ausência do gene *ZRGI* exercia influência nos principais fatores de virulência de *C. gattii*. Os resultados demonstram que não há alteração da termotolerância das linhagens mutantes e que não há alteração da sensibilidade ao estresse causado por diferentes agentes. Portanto, a ausência do gene *ZRGI* não interfere no crescimento de *C. gattii* em condições de temperatura e presença de agentes estressores. Nesta linha, aparentemente, o metabolismo de zinco não interfere nestas características de *C. gattii* (Schneider *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2015).

Quando avaliamos a sensibilidade das nossas linhagens mutantes ao fármaco Flucitosina (5-FC), observamos que essas apresentaram uma sensibilidade maior de crescimento quando comparadas com a linhagem R265 *WT*. Esse efeito foi observado não somente nas linhagens *ZRGIΔ.99* e *ZRGIΔ.219*, mas também na linhagem *ZRG* (mutante nulo selecionado da biblioteca). A Flucitosina funciona como um análogo a pirimidinas, a base da sua atividade antifúngica é a sua incorporação em grupos de nucleotídeos, após sofrer

bioconversão para o metabolito ativo, conhecido como 5-fluorouracilo. A terapia de combinação de AmB com 5-FC aumenta a atividade fungicida desses fármacos e diminui as altas taxas de resistência espontânea, que dificultam a utilização de 5-FC como monoterapia para infecções fúngicas (Banerjee *et al.* 2014). Hipotetizamos que essa sensibilidade possa estar relacionada com o fato de que a ausência do gene *ZRG1* provoca uma alteração na homeostase de metais nas células de *C. gattii*, deixando a célula fúngica em um estado de "carência" nutricional, que por sua vez exerce influência na capacidade de aquisição de resistência dessa linhagem ao fármaco, tornando-a mais susceptível a sua ação antifúngica.

Realizamos ensaios de concentração inibitória mínima para avaliar de forma quantitativa a sensibilidade das nossas linhagens mutantes. Submetemos as linhagens *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* e a linhagem R265 *WT* a concentrações crescentes dos agentes quelantes TPEN e DTPA e dos metais zinco e manganês por um período de 24 h. A análise do crescimento relativo das linhagens nos mostrou que os mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* apresentam sensibilidade de crescimento quando cultivados em meio contendo TPEN em relação a linhagem R265 *WT*, para todas as concentrações testadas no ensaio, assim como quando cultivadas em meio contendo o quelante DTPA. Esse resultado confirma que a ausência do gene *ZRG1* torna as células de *C. gattii* incapazes de crescer em ambientes sem disponibilidade de metal, sugerindo a relação direta entre a homeostase de metais e nosso gene alvo, como observamos anteriormente na análise do perfil de expressão desse gene. Os resultados para o mutante *ZRG1Δ.99* foram desconsiderados na análise de crescimento com o quelante DTPA porque geraram uma leitura de densidade celular inferior a leitura do branco. Porém, quando cultivamos as linhagens mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* em meio contendo concentrações crescentes de zinco, essas se mostraram sensíveis em relação a linhagem R265 *WT* para todas as concentrações testadas, diferente do resultado que esperávamos. A adição de zinco ao meio de cultivo se mostrou tóxica para os mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219*. A adição de manganês ao meio de cultivo também se mostrou tóxica para as linhagens mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* em relação a linhagem R265 *WT*, porém, esse efeito só foi observado em concentrações superiores a 2 mM de manganês, em concentrações inferiores o crescimento relativo das linhagens mutantes foi semelhante ao crescimento de R265 *WT*. Esses resultados sugerem que o gene *ZRG1* pode codificar uma proteína envolvida no metabolismo de efluxo de zinco nas células de *C. gattii*, pois como observamos nos resultados do MIC, nossas linhagens mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* se mostram sensíveis a adição de zinco ao meio de cultivo, mesmo em concentrações baixas, sugerindo uma toxicidade que

pode estar relacionada a ausência de expressão de gene *ZRG1*, alterando o mecanismo de homeostase desse metal. Esse efeito porém, não foi observado para o manganês, pois sua adição se mostrou tóxica somente em concentrações altas do metal, sugerindo que o gene *ZRG1* não possui influência direta nos mecanismos de homeostase desse metal.

A produção de melanina é outro importante fator de virulência de *Cryptococcus*, que serve para, entre outras funções, proteger a célula contra a oxidação e a ação de enzimas líticas no ambiente intrafagossomal, durante uma resposta imune do hospedeiro (Zhu e Williamson, 2004, Panepinto e Williamson, 2006). Realizamos um teste de melanização em meio sólido L-DOPA para avaliar de forma qualitativa se a ausência de *ZRG1* exercia influência sobre essa característica. Nossos resultados demonstram que as linhagens mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* são capazes de produzir melanina, mas não diferem de forma significativa da linhagem R265 WT.

Avaliamos também a capacidade de formação de cápsula das linhagens mutantes *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219*. Observamos que não houve redução no tamanho da cápsula das linhagens mutantes em comparação com a linhagem R265 WT (Figura 13B). Esse resultado sugere que a deleção do gene *ZRG1* não interfere na capacidade de formação de cápsula nas células de *C. gattii*.

Macrófagos alveolares são fundamentais para a defesa do hospedeiro contra patógenos pulmonares. Estes são capazes de fagocitar e eliminar patógenos invasores, além de apresentar antígenos para células T ativadas, estimulando uma resposta imune adaptativa (Wager *et al.*, 2016). Realizamos um ensaio de interação entre macrófagos alveolares da linhagem murina J774.1 e células de *C. gattii* das linhagens mutantes nulos *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* e da linhagem R265 WT por um período de 2 h, para avaliar se a ausência do gene *ZRG1* poderia exercer influência no reconhecimento das células fúngicas por parte do sistema imune. O resultado nos mostra que os mutantes nulos *ZRG1Δ.99* e *ZRG1Δ.219* foram menos fagocitados em comparação com a linhagem R265 WT, quando utilizamos a razão entre células fúngicas fagocitadas/células de macrófagos murinos J774.1 para a análise. Estes dados sugerem ampla diversidade de funções desta proteína, visto que mutantes deficientes na captação de zinco são mais facilmente fagocitados (Schneider *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2015).

A cápsula de *Cryptococcus* é uma estrutura complexa, composta de glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e, em menor grau, manoproteínas e está ancorada à parede celular, que é composta de quitina, quitosana, glucanas e

glicoproteínas (Doering, 2009; O'Meara e Alspaugh, 2012). A cápsula é dinâmica e aumenta drasticamente a espessura durante a infecção. Além disso, a cápsula serve para mascarar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que podem ser reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) em células hospedeiras, permitindo que *Cryptococcus* evite o sistema imunológico através da prevenção da fagocitose e pode ajudar a proporcionar proteção contra espécies ROS e peptídeos antimicrobianos (Zaragoza *et al.* 2008). A opsonização de *Cryptococcus* com anticorpos anti-capsulares é necessária para a fagocitose *in vitro* pelas células imunológicas devido às propriedades anti-fagocíticas da cápsula (Kozel, 1993).

Apesar de não termos observado diferença qualitativa no tamanho da cápsula das linhagens mutantes em relação à linhagem R265 *WT*, hipotetizamos que a menor taxa de fagocitose pode ter relação direta com alterações na composição e superfície da cápsula dessas linhagens.

6. Conclusões

Os resultados obtidos até o momento, podemos concluir que o gene *ZRG1* tem sua expressão regulada pela disponibilidade/privação de metais, codificando uma proteína que aparentemente pode estar envolvida no mecanismo de efluxo de zinco em células de *C. gattii*, auxiliando na manutenção da homeostase desse metal e evitando os efeitos tóxicos do seu excesso.

7. Referências

Alspaugh, J. A., 2015. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal genetics and biology*, pp. 55-58.

Auld, D. S., 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals*, pp. 271-313.

Banerjee, D., Burkard, L. & Panepinto, J. C., 2014. Inhibition of nucleotide biosynthesis potentiates the antifungal activity of amphotericin B. *PLoS One*, 9(1).

Bielska, E. & May, R.C., 2016. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS Yeast Research*, 16(1), p.fov106. Available at: <http://femsyr.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/femsyr/fov106>.

Byrnes Edmond J., I.J. et al., 2011. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in Southern Californian HIV/AIDS patients. *PLoS pathogens*, 7(9).

Byrnes, E.J. et al., 2010. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS pathogens*, 6(4), p.e1000850.

Cassat, J. E. & Skaar, E. P., 2012. Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity. *Seminars Immunopathology*, 34(2), pp. 215-235.

Coelho, C., Bocca, A.L. & Casadevall, A., 2014. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, 87, pp.1–41.

Cogliati, M., 2013. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*, 2013(serotype D), p.675213. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3820360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Cox, G. M. *et al.*, 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 39(1), pp. 166-175.

Cox, G. M. *et al.*, 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and immunity*, 68(2), pp. 443-448.

Chen, S.C. *et al.*, 1997. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *The Journal of infectious diseases*, 175(2), pp. 414-420.

Cheng, P.Y., Sham, A. & Kronstad, J.W., 2009. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(10), pp.4284–4294.

Chou, K. C. & Shen, H. B., 2008. Cell-PLoc: a package of web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nat. Proto.*, 3(2), pp. 153-162.

Chun C. D. & Madhani H. D., 2010. Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 5(9).

de Gontijo, F. A. *et al.*, 2014. The role of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway in *Cryptococcus neoformans* high temperature growth and virulence. *Fungal genetics and biology*, pp. 12-23.

Doering, T. L., 2009. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annual review of microbiology*, pp. 223-247.

Eisenman, H.C. & Casadevall, A., 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), pp.931–940.

Ganendren, R. *et al.*, 2006. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes and infection*, 8(4), pp. 1006-1015.

Gibson, J.F. & Johnston, S.A., 2014. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetics and Biology*.

Góngora-Rivera, F. *et al.*, 2000. The clinical spectrum of neurological manifestations in AIDS patients in Mexico. *Archives of medical research*, 31(4), pp. 393-398.

Granger, D. L., Perfect, J. R. & Durack D. T., 1985. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *The journal of clinical investigation*, 76(2), pp. 508-516.

Hood, M. I. & Skaar, E. P., 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature reviews. Microbiology*, 10(8), pp. 525-537.

Kmetzsch, L. *et al.*, 2011. Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. *Molecular Microbiology*, 81(1), pp.206–218.

Kozel, T. R., 1993. Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Archives of medical research*, 24(3), pp. 211-218.

Kraus, P.R., Nichols, C.B. & Heitman, J., 2005. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. *Eukaryotic Cell*, 4(6), pp.1079–1087.

Krough, A. *et al.*, 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol*, 305(3), pp. 567-580.

Kwon-Chung, K. J. & Saijo, T., 2015. Is *Cryptococcus gattii* a Primary Pathogen? *Journal of fungi*, 1(2), pp. 154-167.

Franzot, S.P., Salkin, I.F. & Casadevall, A., 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), pp.838–840.

Leimann, B. C. & Koifman R. J., 2009. Official information systems for cryptococcal meningitis, state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 43(4), pp. 717-720.

Li, L. *et al.*, 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.*, 13(9), pp.2178-89.

Lin, X. & Heitman, J., 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu.Rev.Microbiol.*, 60(0066-4227 (Print)), pp.69–105. Available at: C:\KARSTEN\PDFs\Mykologie-PDFs\Myk-2006\Lin - Heitman-The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex.pdf.

Liu, T., Perlin, D.S. & Xue, C., 2012. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence*, 3(April), pp.173–181.

Lizaro, J. *et al*, 2014. Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infections in Colombia from 1997-2011. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(11).

MacDougall, L. *et al.*, 2007. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), pp.42–50.

Marr, K. A. *et al.*, 2012. *Cryptococcus gattii* infection in healthy hosts: a sentinel for subclinical immunodeficiency? *Clin. Infect. Dis.* 54, pp. 153–154.

Maziarz, E. K. & Perfect, J. R., 2016. Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 30(1), pp. 179-206.

McCusker, J. H. *et al.*, 1994. *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42 degrees C and form pseudohyphae. *Infection and immunity*, 62(12), pp. 5447-55.

McDade, H. C. & Cox, G. M., 2001. A new dominant selectable marker for use in *Cryptococcus neoformans*. *Medical mycology*, 39(1), pp. 151-154.

Ngamskulrungrroj, P. *et al.*, 2012. The Primary Target Organ of *Cryptococcus gattii* Is Different from That of *Cryptococcus neoformans* in a Murine Model. , 3(3), pp.1–9.

Nosanchuk, J.D. & Casadevall, A., 2006. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), pp.3519–3528.

Noverr, M. C. *et al.*, 2003. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infection and immunity*, 71(3), pp. 1538-47.

O'Meara, T. R. & Alspaugh, J.A., 2012. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clinical microbiology reviews*, 25(3), pp. 387-408.

Osterholzer, J. J. *et al.*, 2009. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *The American journal of pathology*, 174(3), pp. 932-943.

Panepinto, J. C. & Williamson, P. R., 2006. Intersection of fungal fitness and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast research*, 5(1), pp. 489-498.

Park, B.J. *et al.*, 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4), pp.525–530. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676>.

Rivera, J. *et al.*, 1998. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. *Infection and immunity*, 66(10), pp. 5027-30.

Saijo, T. *et al.*, 2014. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. *mBio*, 5(2).

Singh, A. *et al.*, 2013. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *mBIO*, 4(3).

Schneider, Rde O. *et al.*, 2015. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Scientific reports*, 7(5).

Schneider, Rde O. *et al.*, 2012. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One*, 7(8).

Shi, M. *et al.*, 2010. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *The journal of clinical investigation*, 120(5), pp. 1683-93.

Srinikanta, D., Santiago-Tirado, F. H. & Doering, T. L., 2014. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*, 31(2), pp. 47-60.

Vartivarian, S. E. *et al.*, 1993. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *The journal of infectious diseases*, 167(1), pp. 186-190.

Velagapudi, R. *et al.*, 2009. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(10), pp.4345–4355.

Vidal, J. E. *et al.*, 2013. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *Braz. J. Infect. Dis.*, 17(3), pp. 353-362.

Wager, C. M. L. *et al.*, 2016. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. *Frontiers in Microbiology*, 7(105)

Wright, L. C. *et al.*, 2007. Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. *Eukaryotic cell*, 6(1), pp. 37-47.

Yu, J.H. *et al.*, 2004. Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), pp.973–981.

Zaragoza, O. *et al.*, 2008. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cellular microbiology*, 10(10), pp. 2043-57.

Zhu, X. & Williamson, P. R., 2004. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast research*, 5(1), pp. 1-10.

