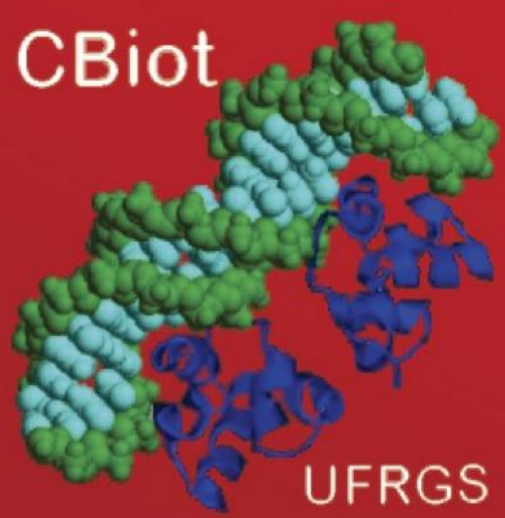


# Avaliação da expressão de proteínas ligadoras de zinco na imunidade inata em modelo de *Cryptococcus gattii*



Alícia Corbellini Piffer<sup>1</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia e <sup>2</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Instituto de Biociências, UFRGS.

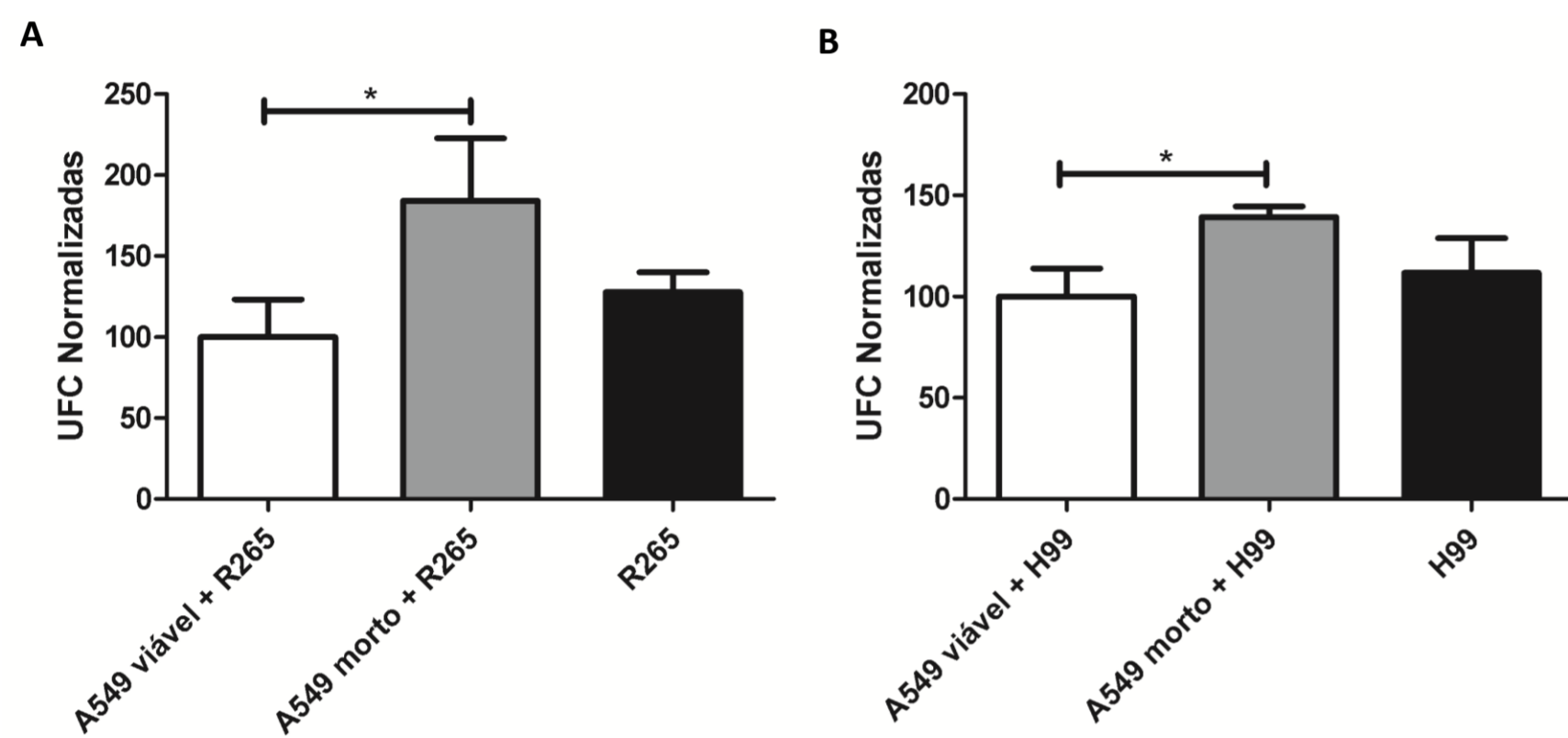
aliciacpiffer@gmail.com

## INTRODUÇÃO

As leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os agentes causadores da criptococose, uma enfermidade que pode acometer vários órgãos, dentre eles a pele, os pulmões e o sistema nervoso central. A infecção ocorre a partir da inalação de esporos ou leveduras dessecadas que se alojam no alvéolo podendo causar quadros de pneumonia. Neste ambiente, o fungo encontra como primeiro obstáculo, além de macrófagos alveolares, células epiteliais pulmonares, as quais, além de atuarem como uma barreira física, secretam moléculas que atuam no sistema imune. O patógeno também encontra como limitação a privação de nutrientes importantes para o seu desenvolvimento, mecanismo de defesa do hospedeiro conhecido como imunidade nutricional. Dentre os nutrientes que estão com a biodisponibilidade diminuída está o metal zinco, relacionado com várias funções moleculares em praticamente todos os organismos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de células epiteliais e a expressão de proteínas ligadoras de zinco na imunidade inata e sua associação como um mecanismo de imunidade nutricional no modelo *C. gattii*.

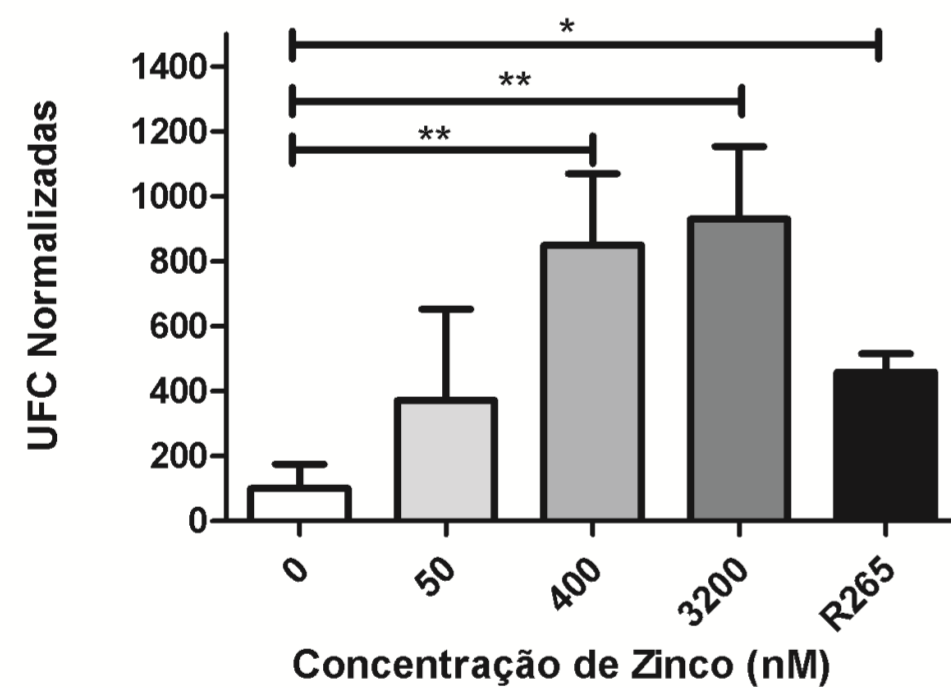
## RESULTADOS

1



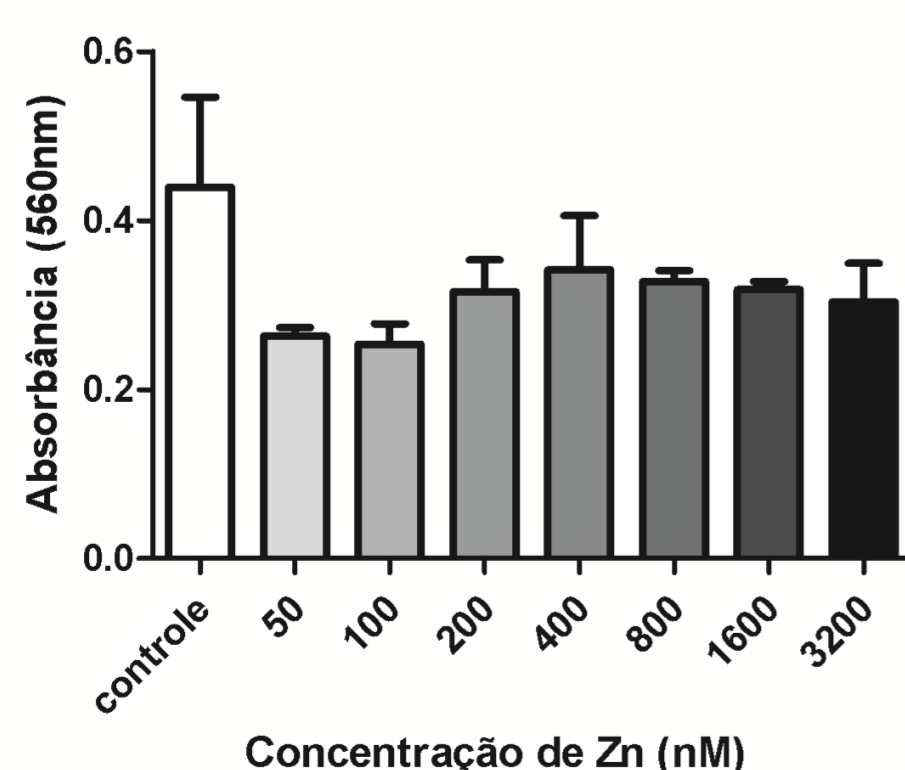
**Fig 1. Células epiteliais pulmonares apresentam atividade antifúngica.** A interação de células epiteliais A549 viáveis com células de levedura de *C. gattii* (A) ou *C. neoformans* (B) apresentou uma menor quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) do que a interação de células dos fungos testados com células epiteliais A549 mortas. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  DP de três réplicas experimentais de cada uma das três réplicas técnicas. Os valores foram normalizados pela condição A549 viável + R265 (A) ou A549 viável + H99. O teste utilizado foi *t-Student*. \*  $p < 0,05$ .

2

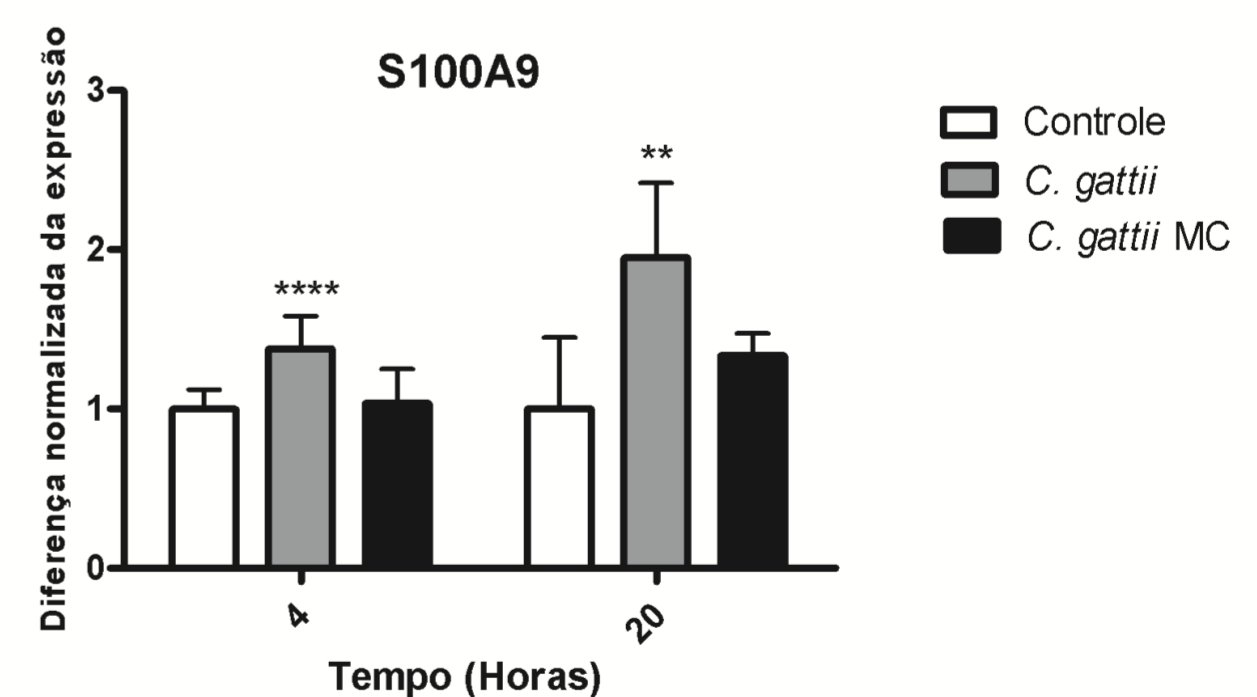
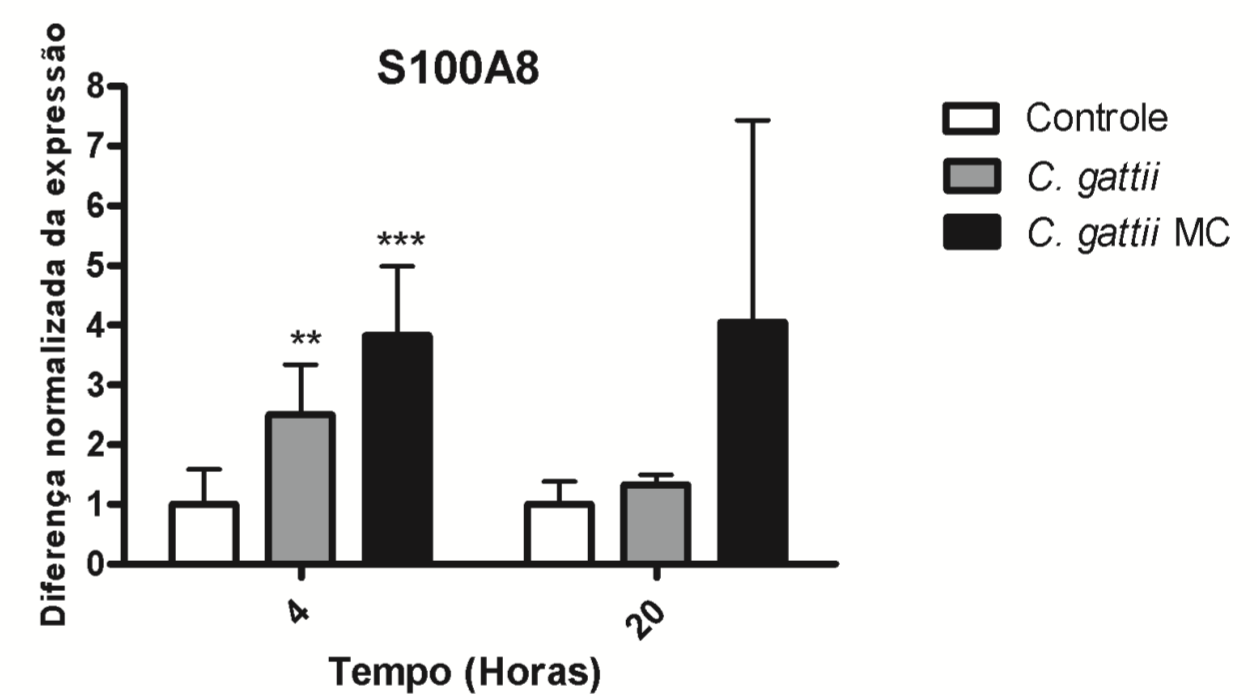
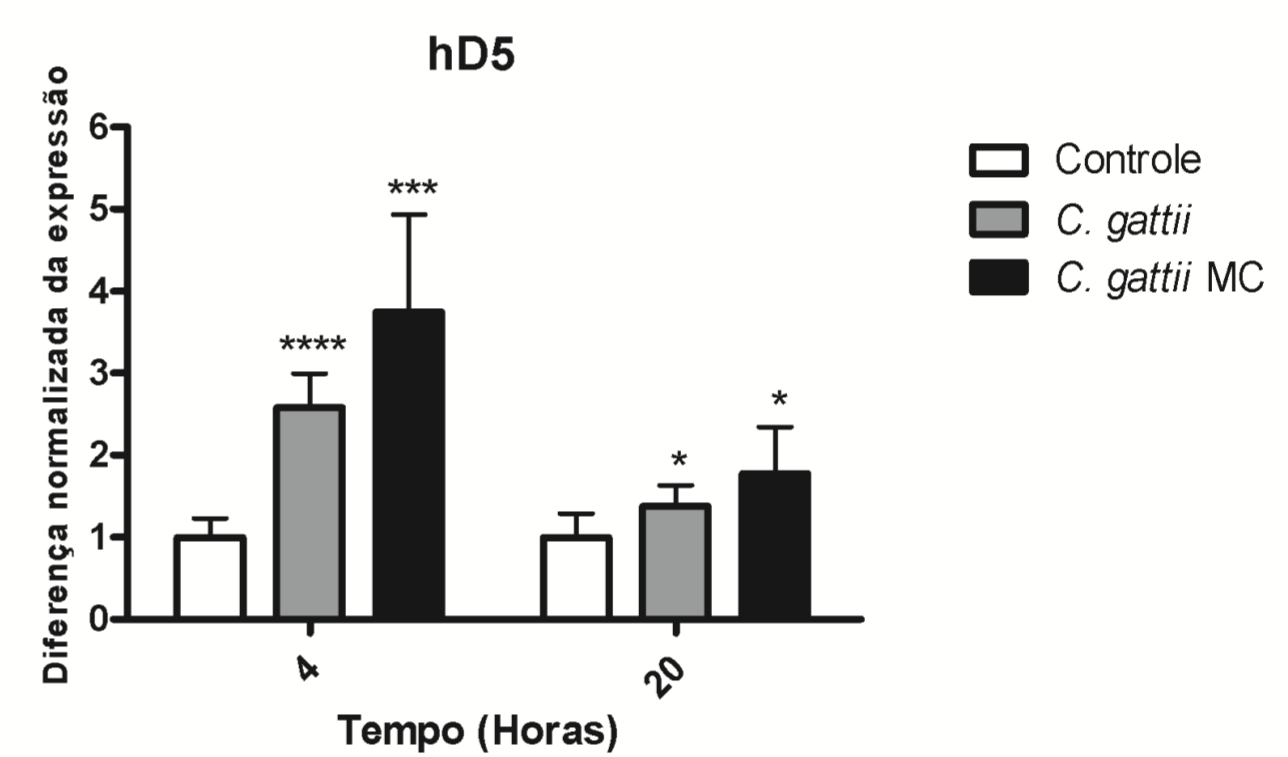


**Fig 2. A atividade antifúngica das células epiteliais pulmonares é revertida quando o meio é suplementado com cloreto de zinco.** O meio celular foi suplementado com diferentes concentrações de cloreto de zinco (50 nM, 400 nM, 3,2  $\mu$ M) e avaliou-se, através da metodologia de unidades formadoras de colônias, a atividade antifúngica das células. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  DP de três réplicas experimentais de cada uma das três réplicas técnicas. Os valores foram normalizados pelo controle, condição sem adição de zinco. O teste utilizado foi *t-Student*. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,005$ .

3



**Fig 3. A linhagem de células epiteliais pulmonares A549 não apresentou viabilidade diminuída frente às concentrações de cloreto de zinco testadas.** Foram avaliadas diferentes concentrações do sal cloreto de zinco (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM, 1,6  $\mu$ M e 3,2  $\mu$ M) a fim de verificar se havia alteração na viabilidade celular, o qual foi medido indiretamente através do teste de atividade mitocondrial por MTT.



**Fig 4. A expressão da defensina hD5 e do complexo calprotectina é aumentada durante a interação com *C. gattii*.** Foram avaliadas, através da metodologia de PCR quantitativo em tempo real, o nível de transcritos dos genes defensina humana 5 (hD5) do complexo calprotectina (S100A8 e S100A9) após interação de 4 horas ou 20 horas. Em ambos os tempos testados (A, B, C), houve um aumento no nível relativo de transcritos dos três genes de interesse, mas esse aumento ficou mais evidente no tempo de 4 horas.

## CONCLUSÕES

Sugerimos que as células epiteliais pulmonares apresentam ação antifúngica, aumentando a secreção de proteínas ligadoras de zinco e com isso diminuindo a biodisponibilidade deste metal para o uso da levedura *C. gattii*, sendo esse um mecanismo de imunidade nutricional.