



SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA XXVIII SIC

paz no plural



Evento	Salão UFRGS 2016: SIC - XXVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2016
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Prospecção de novos genes envolvidos no metabolismo de zinco em <i>Cryptococcus gattii</i>
Autor	CAMILA DIEHL DA ROSA
Orientador	CHARLEY CHRISTIAN STAATS

Prospecção de novos genes envolvidos no metabolismo de zinco em *Cryptococcus gattii*

Aluna: Camila Diehl Orientador: Charley C. Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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. Nesse contexto, 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 realizado e levou à identificação de um mutante (25-C12) 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* 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 estudar especificamente a função desse gene, decidimos realizar a construção de mutantes nulos para o gene *ZRG1*. Para isso, fragmentos de aproximadamente 1 kb das regiões 3' e 5' de flanqueamento 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 *pDONR-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 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 *ZRG1*. Utilizando esses mutantes, estamos iniciando os ensaios de caracterização fenotípica, que possam identificar alterações associadas à inativação do gene *ZRG1*, assim como alterações na virulência da linhagem. Estas linhagens serão caracterizadas através da realização de ensaios como capacidade crescimento a 37 °C, formação de cápsula e melanina, sensibilidade à interação com macrófagos, taxa de fagocitose e replicação intrafagossômica, avaliação de níveis intracelulares de zinco e ROS.