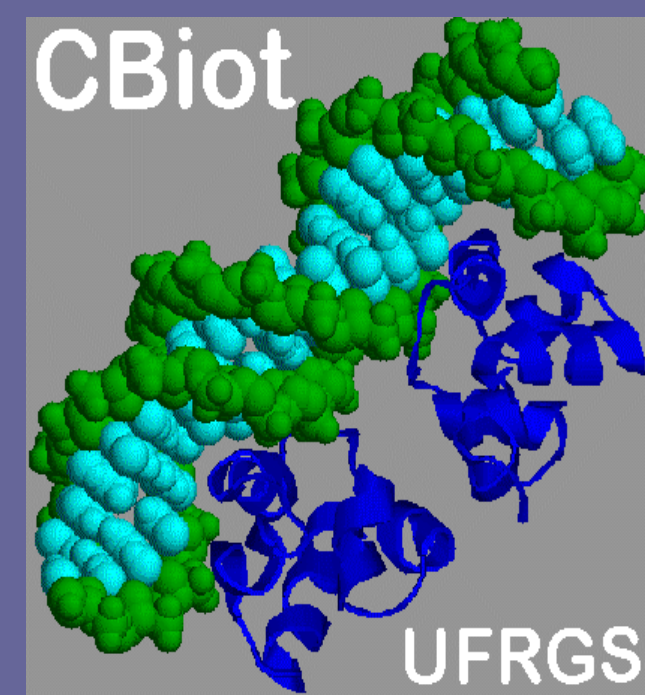


# Análise de genes envolvidos em modificações estruturais da cápsula da levedura *Cryptococcus gattii*.

Luana Kammler<sup>1,2</sup>, Charley Christian Staats<sup>2</sup>, Lívia Kmetzsch<sup>2</sup>, Augusto Schrank<sup>2</sup>, Marilene Vainstein<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Aluna de Graduação em Farmácia, Bolsista de Iniciação Científica CNPq; <sup>2</sup> Centro de Biotecnologia, UFRGS



## INTRODUÇÃO

*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são leveduras patogênicas e agentes etiológicos da criptococose, doença que, em sua manifestação mais grave, é caracterizada por meningoencefalite. O potencial patogênico destes fungos é devido, em parte, aos polissacarídeos presentes na cápsula deste microrganismo. Dentre estes polissacarídeos, os mais abundantes são a galactoxinomanana (GalXM) e a glicuronoxilomanana (GXM), a qual possui a capacidade de modular o sistema imune. Diferenças antigênicas decorrentes de variações estruturais na molécula de GXM ocorrem entre *C. neoformans* e *C. gattii*. Em consequência disto, estas diferenças estruturais conferem diferentes potenciais imuno-modulatórios a estas moléculas.

## OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é identificar genes relacionados a inserção de modificações estruturais nas moléculas de GXM de *Cryptococcus gattii*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Oitocentos mutantes de uma biblioteca com inserção aleatória de T-DNA foram avaliados para a presença de uma modificação específica na molécula de GXM, a qual é reconhecida pelo anticorpo 13F1. Esta modificação confere à molécula de GXM a propriedade de imunomodulação positiva, aumentando os níveis de NO em macrófagos e ativando a via de sinalização por NF- $\kappa$ B. Esta avaliação foi realizada empregando a metodologia de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), com captura das células utilizando o anticorpo específico 13F1, seguido da incubação com anticorpo 18B7, que reconhece a estrutura geral e conservada de GXMs. O sistema foi então revelado com peroxidase ligada ao anticorpo anti-18B7. Mutantes selecionados foram avaliados por Imunofluorescência para confirmação da ausência de reatividade ou reatividade reduzida com o anticorpo 13F1, o que pode indicar uma determinada modificação específica na molécula de GXM. Para tal, células dos referidos mutantes foram cultivadas por 48 horas em meio mínimo indutor de cápsula. Após marcação com 5 $\mu$ g/mL de *calcofluor white* (marcação para parede celular), as células foram incubadas com 20 $\mu$ g/mL dos anticorpos 13F1 ou 18B7. Para revelação foi utilizado um anticorpo secundário conjugado à FITC.

## RESULTADOS

Após as análises de 800 mutantes de *C. gattii* por ELISA, foram selecionados 3 mutantes com reatividade reduzida com o anticorpo 13F1. Estes mutantes foram avaliados por Imunofluorescência (Figura 1). Estes resultados evidenciaram que o mutante 4F2 possui reatividade diminuída com o anticorpo 13F1 em relação ao controle (linhagem selvagem *C. gattii* R265). Como controle negativo, utilizamos um linhagem de *C. gattii* que possui GXM não reconhecida pelo anticorpo 13F1, a qual possui propriedades de imunomodulação positiva (Fonseca et al., 2010).

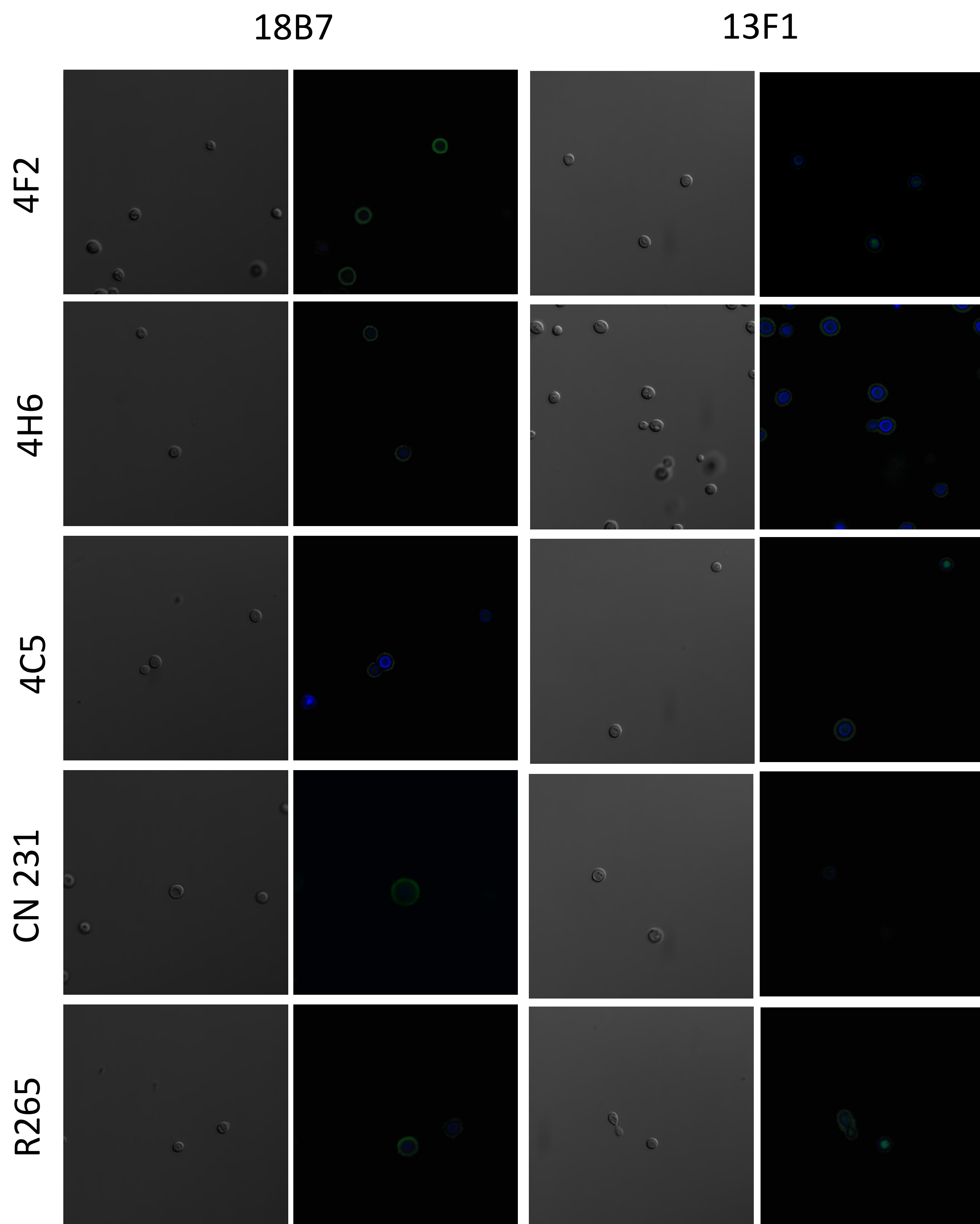


Figura 1. Imagens de Imunofluorescência de linhagens selecionadas de *C. gattii*. As células foram marcadas com *calcofluor white* (azul), e com os anticorpos 18B7 ou 13F1 (verde, anticorpo secundário conjugado a FITC).

## PERSPECTIVAS

- Identificação do gene inativado no mutante de *C. gattii* 4F2
- Purificação do polissacarídeo GXM do mutante de *C. gattii* 4F2
- Determinação do diâmetro da fibra de GXM do referido mutante
- Ensaio de interação com macrófagos para determinação da produção NO estimulada por GXM do mutante 4F2

## APOIO FINANCEIRO

CNPq e CAPES