

INTRODUÇÃO

A levedura *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico da criptococose, doença caracterizada pelo desenvolvimento de graves quadros de meningoencefalite (Sabiiti and May, Future Microbiol. 7:1297-1313, 2012). Este patógeno é capaz de sobreviver no interior de células fagocíticas, sendo considerado um importante fator determinante em sua virulência (Wang, Nature Reviews Microbiol. 9:193-203, 2011). Quando internalizada em macrófagos, esta levedura é então submetida a diversas condições de estresse que limitam seu desenvolvimento, como exposição a peptídeos antimicrobianos, pH ácido, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, micronutrientes essenciais são suprimidos do ambiente intracelular de macrófagos pela expressão de transportadores específicos, mecanismo conhecido como imunidade nutricional (Hood and Skaar, Nature Reviews Microbiol. 10:525-537, 2012). Metais de transição, como ferro, zinco e cobre, são necessários para qualquer organismo e a biodisponibilidade destes é imprescindível para a sobrevivência e proliferação de micro-organismos patogênicos durante a infecção. A partir de estudos recentes, a importância do metal cobre vem sendo ressaltada como alvo da imunidade nutricional (Thiele, Cell Host & Microbe 13:265–276, 2013). Para sobrepujar estas limitações da disponibilidade de cobre imposta pelo hospedeiro, células de *C. neoformans* expressam em sua superfície transportadores de cobre específicos que têm a função de obter este metal quando estas células se encontram em condições de privação de cobre (Williamson, mBio 3(5):e00285-12, 2012). O projeto no qual este trabalho se insere tem como objetivo principal a avaliação da modulação da homeostasia de Cu em macrófagos ocasionada pela infecção com *C. neoformans*. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de biossensores para avaliar a disponibilidade de cobre no interior de macrófagos infectados com *C. neoformans*.

RESULTADOS

Figura 1: Esquema geral da metodologia utilizada.

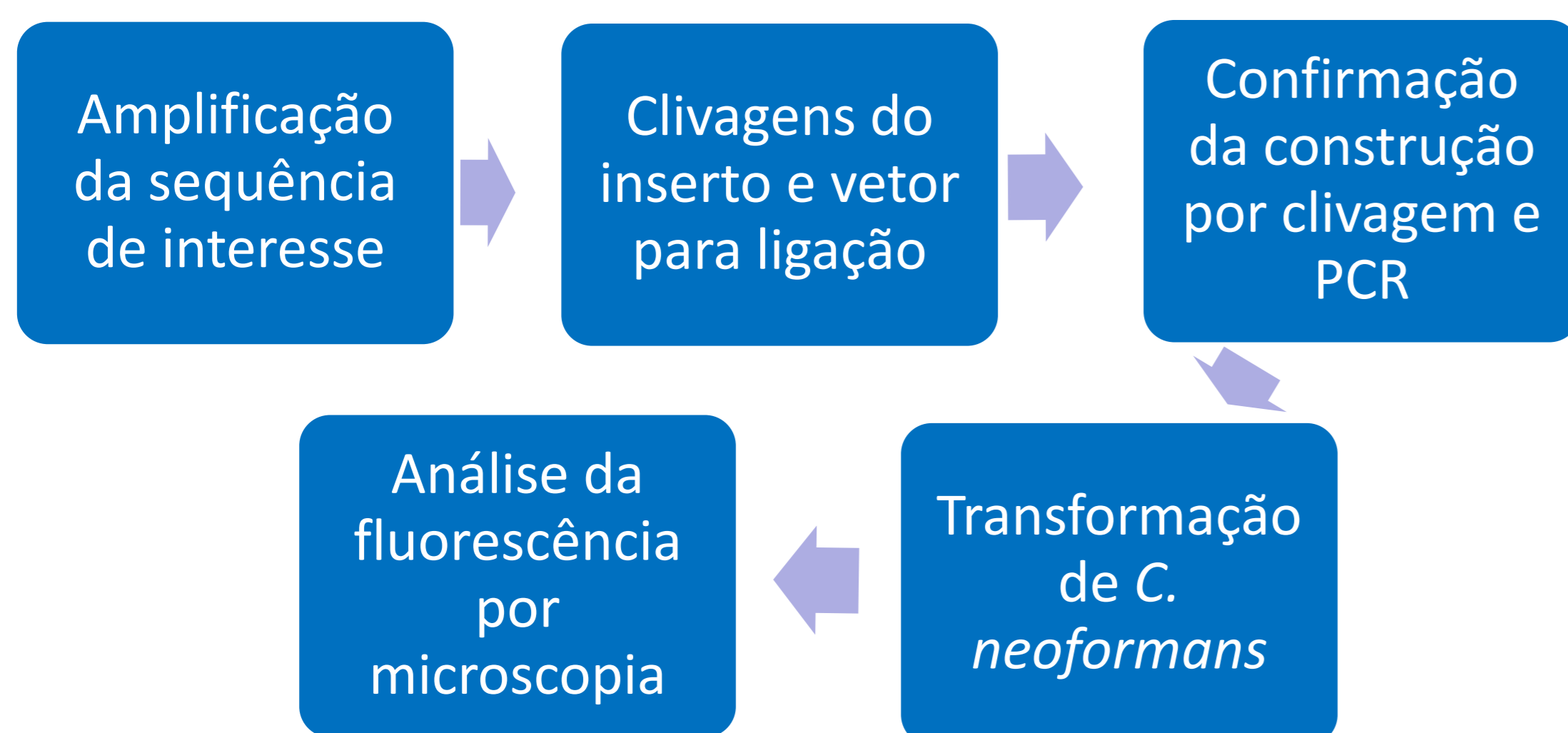


Figura 2: Eletroforese da amplificação da região promotora do gene *CTR4*. Utilizando DNA genômico de *C. neoformans* como molde, a porção regulatória do transportador *CTR4* foi amplificada utilizando os primers *CTR4F* e *CTR4R*. A enzima utilizada foi a Taq Platinum Hi-Fi. M, marcador de tamanho molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), 1 reação com o DNA genômico H99, 2, controle negativo.

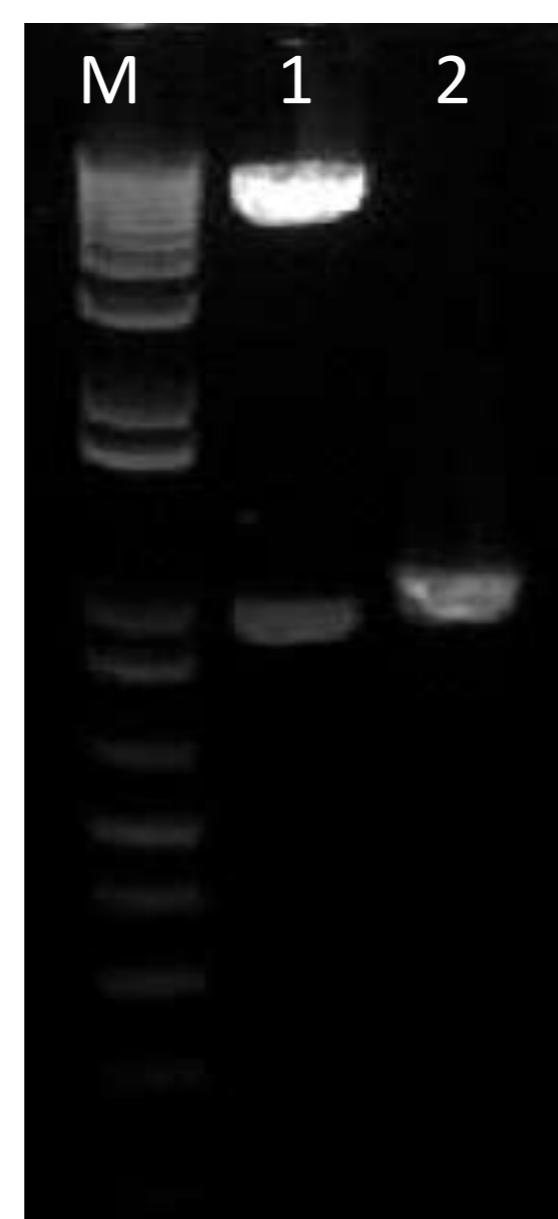


Figura 3: Produto da reação de clivagem do vetor pLKB25 e da região promotora de *CTR4*. O vetor foi clivado com as enzimas *XbaI* e *BglII* (canaleta 1) e região promotora de *CTR4* se deu com as enzimas *BamHI* e *XbaI* (canaleta 2). Eletroforese dos produtos com gel de agarose 0,8%.

Os produtos obtidos foram então purificados e submetidos a ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase durante um tempo de 16h. Posteriormente, células quimiocompetentes da linhagem TG2 de *E. coli* foram transformadas por meio de choque térmico.

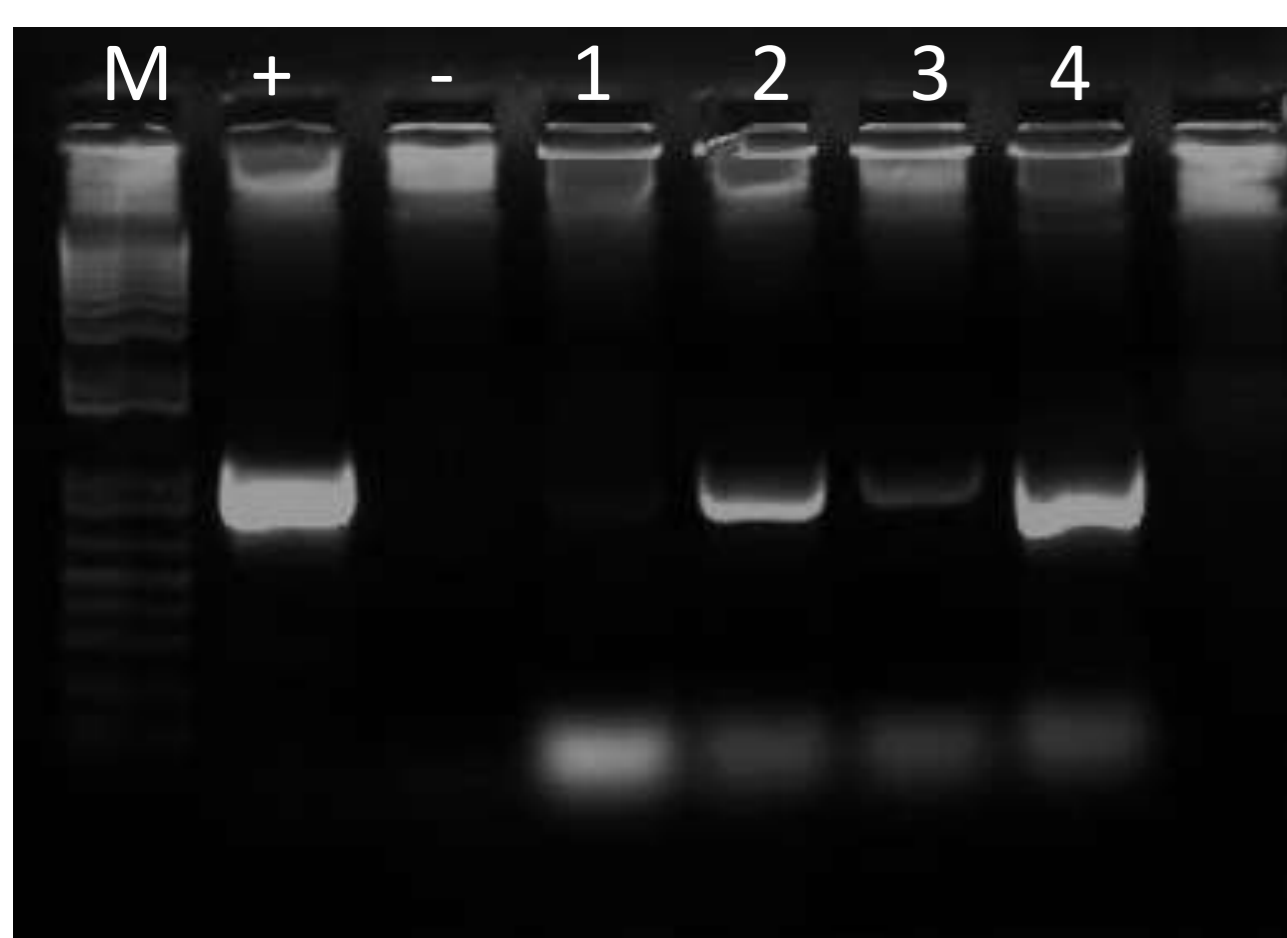


Figura 4: Construção do vetor pCTR4-mCherry. Quatro colônias foram obtidas após a transformação, e foram utilizadas como molde para reação de PCR utilizando os primers *CTR4F* e *CTR4R* para a amplificação da porção regulatória do gene *CTR4*, por meio da enzima Taq Platinum (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. M – marcador, controle positivo, controle negativo, canaletas 1 – 4 clones obtidos.

Figura 5: Confirmação do vetor pCTR4-mcherry. Os plasmídeos referentes aos clones 2 e 4 foram produzidos em maior escala para confirmação por clivagem com enzimas de restrição. Eletroforese dos produtos da restrição clivados com as enzimas *EcoRV* (canaletas 1 e 2), *PstI* (canaletas 3 e 4) e *PvuII* (canaletas 5 e 6) em gel de agarose 0,8%. M – marcador, transformante dois – canaletas 1, 3 e 5, transformante quatro – canaletas 2, 4 e 6.

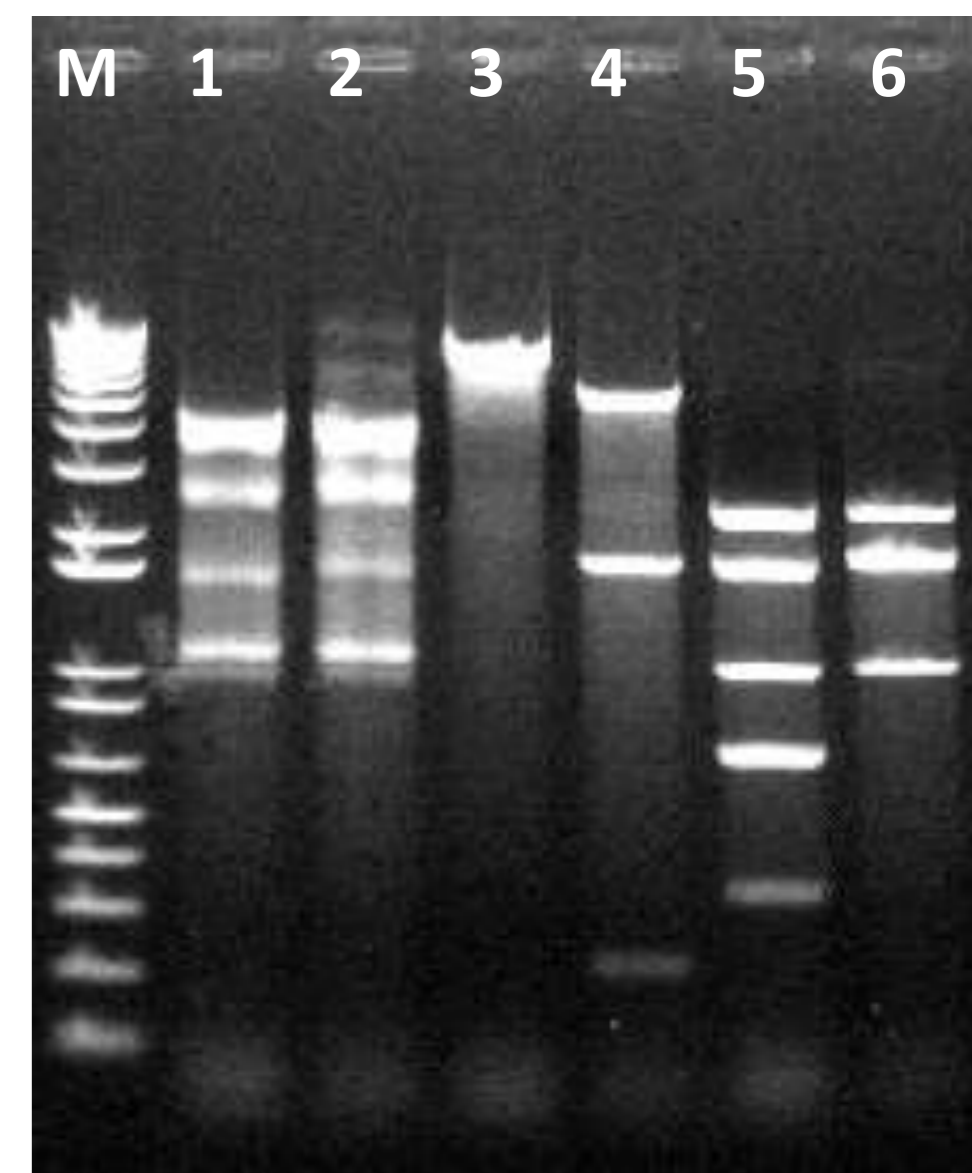


Figura 6: Mapa físico do vetor pCTR4-mCherry. São mostrados o promotor do gene *CTR4* montante à proteína fluorescente vermelha *mCherry*, além da marca de seleção para G418.

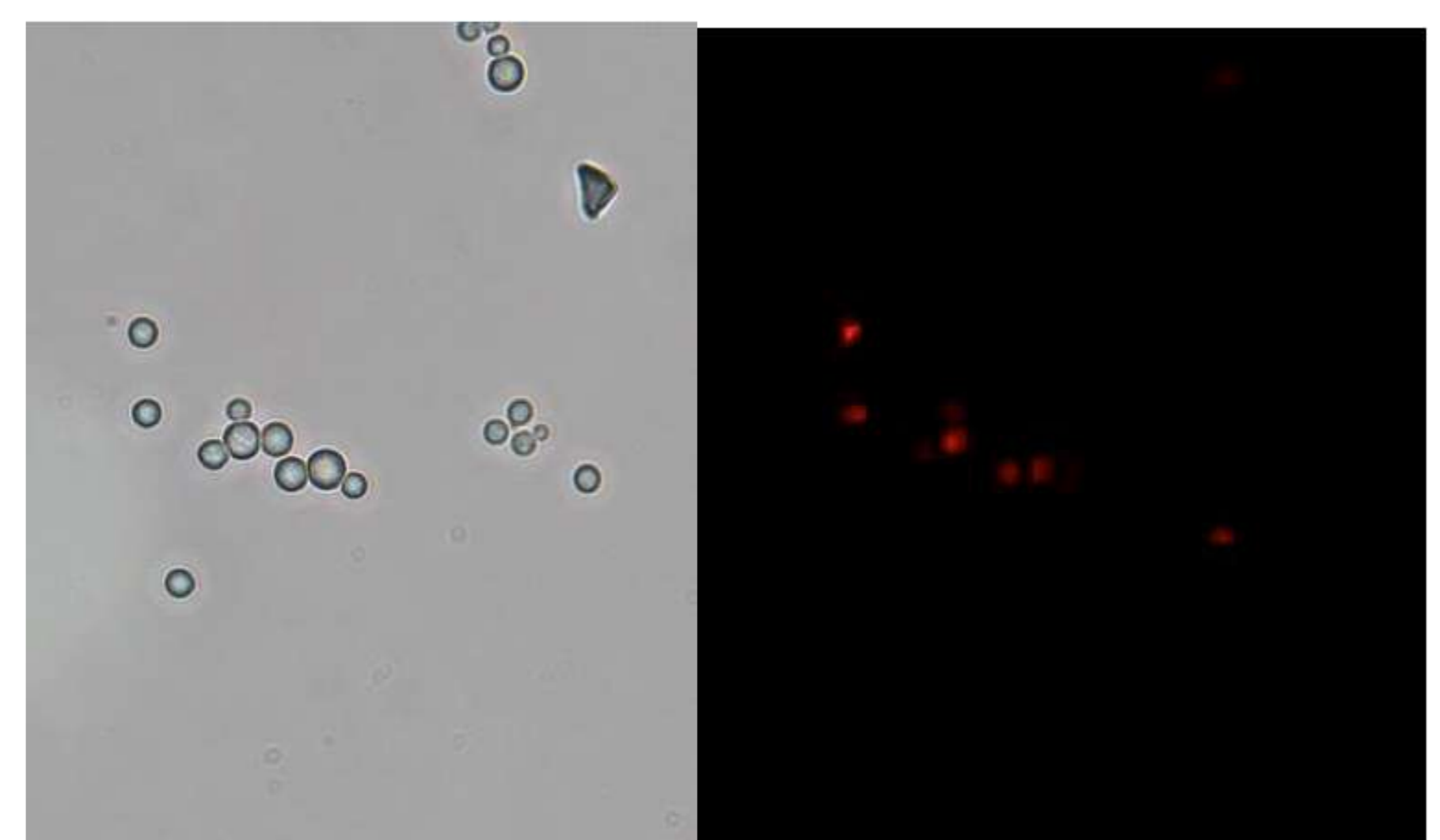
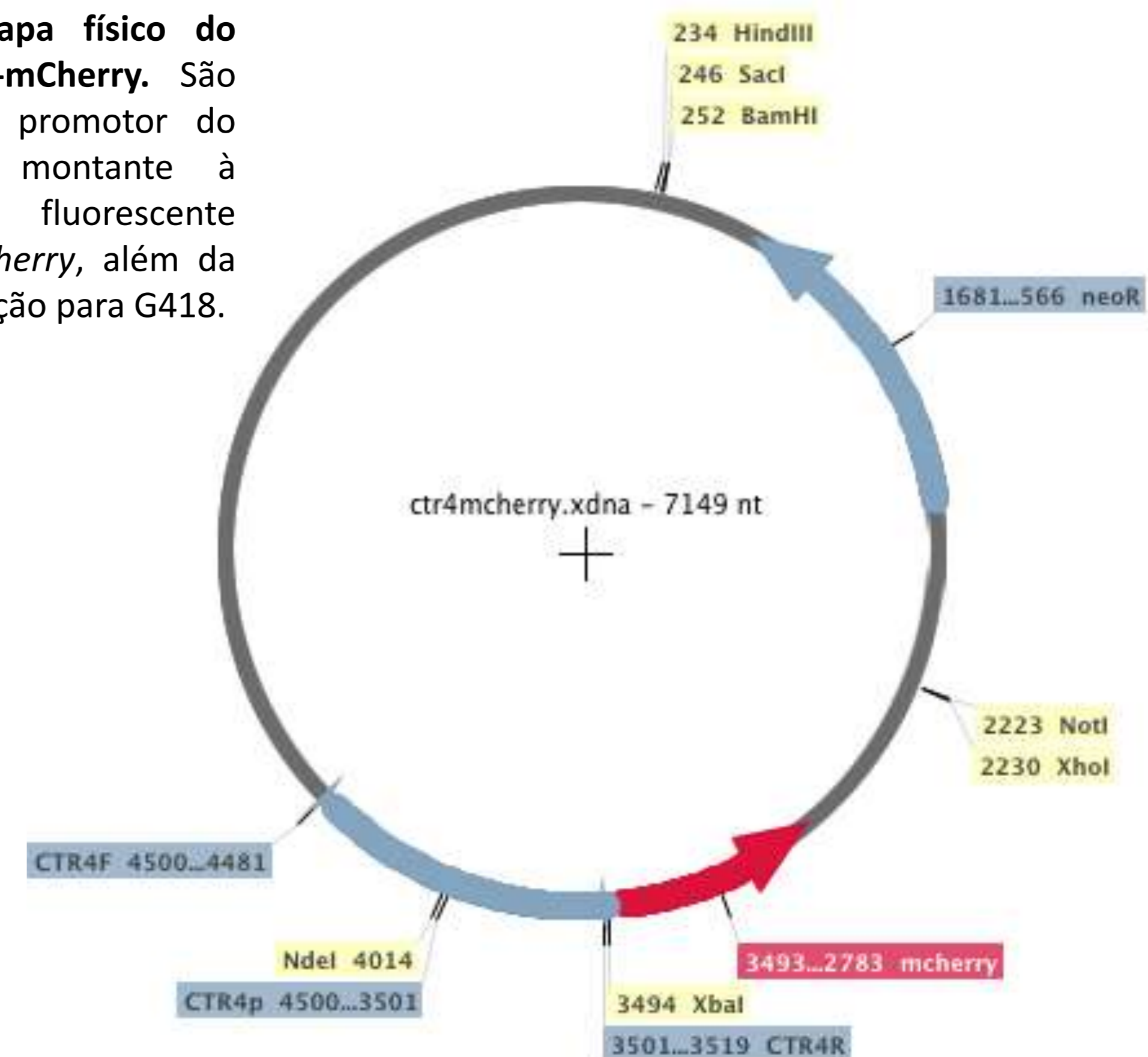


Figura 7: Expressão da proteína fluorescente *mCherry* sob o controle da porção regulatória de *CTR4*, em *C. neoformans*. O plasmídeo referente ao clone 4 (figura 4) foi então produzido em grande escala e purificado. Células da linhagem H99 foram então transformados por biobalística. Das colônias obtidas, cerca de 50 foram cultivadas aleatoriamente em meio YNB líquido acrescido de 1M de CuSO_4 , 1M de BCS, quelante de Cu, ou apenas YNB. A imagem representa condição de limitação de cobre; campo claro, à esquerda, e campo de filtro vermelho, à direita, com aumento de 1000x.

APOIO FINANCEIRO

PERSPECTIVAS