

Avaliação da virulência de linhagens fluorescentes de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Betina Debastiani Benato¹, Marilene henning Vainstein¹

¹-Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS.



INTRODUÇÃO

O uso de marcadores fluorescentes para o monitoramento de tratamentos terapêuticos possibilita a visualização de processos infecciosos *in vivo*, além de permitir determinações quantitativas do patógeno. Sendo assim, a elaboração de linhagens fluorescentes de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* nos permite uma melhor avaliação de potenciais antifúngicos frente à criptococose. A criptococose é uma doença fúngica invasiva causada pelas espécies patogênicas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Mundialmente, afeta aproximadamente, um milhão de indivíduos por ano, causando um alto índice de mortalidade. Estas leveduras possuem fatores de virulência que propiciam ao microrganismo transpor as defesas do hospedeiro infectado. Os principais fatores de virulência em *C. neoformans* e *C. gattii* são a presença de uma cápsula polissacarídica, a síntese de melanina e a habilidade de desenvolvimento a 37°C. Após a construção de linhagens fluorescentes é necessário avaliar se a inserção do gene repórter não interfere nesses fatores, sendo assim, o objetivo desse trabalho é caracterizar os principais fatores de virulência de linhagens fluorescentes de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, possibilitando a utilização dessas linhagens na avaliação antifúngica de um composto identificado pelo nosso grupo, a plumieridina, um iridóide isolado da planta *Allamanda polyantha*.

RESULTADOS

1. Construção de linhagens fluorescentes de *C. gattii* e *C. neoformans*

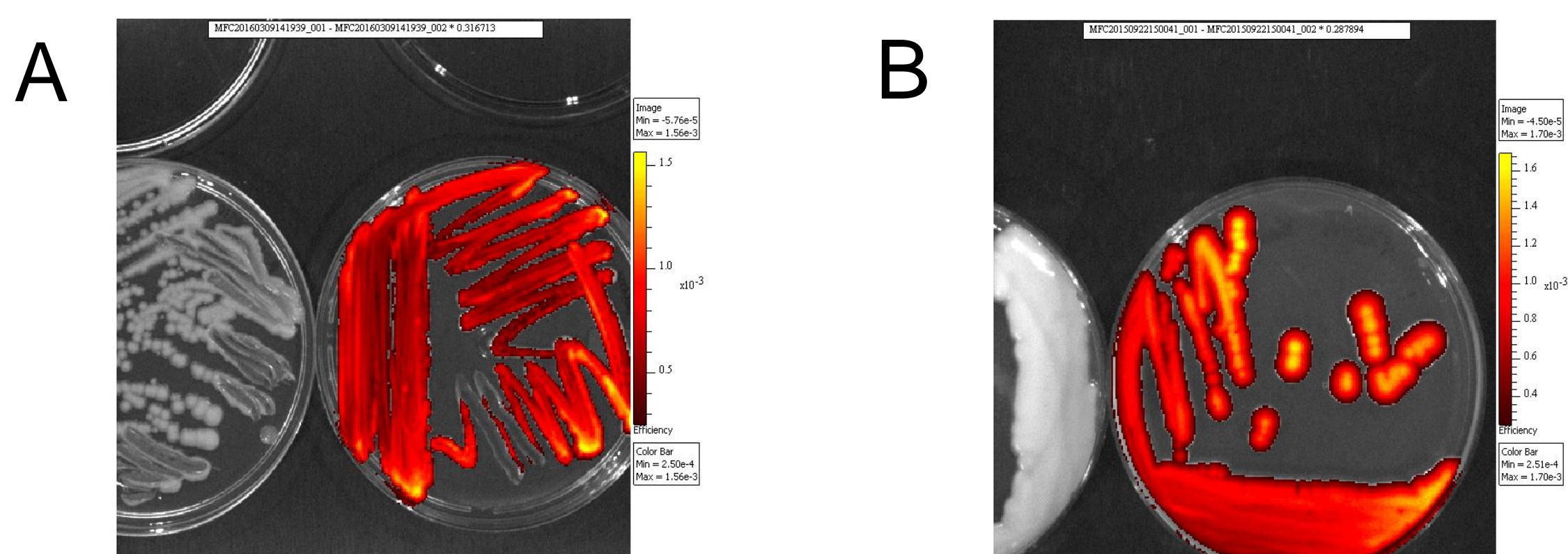


Figura 1. Emissão da fluorescência detectada pelo software *Living Image* 3.1 no equipamento Ivis Lumina. As linhagens fluorescentes R265 de *C. gattii* (A) e H99 de *C. neoformans* (B) expressam constitutivamente o gene repórter Katushka. Os parâmetros utilizados no software *Living Image* 3.1 são f/stop: 4, binning: 4 e 2 segundos de exposição para a detecção da célula.

2. Análise dos principais fatores de virulência

2.1 Desenvolvimento a 37°C

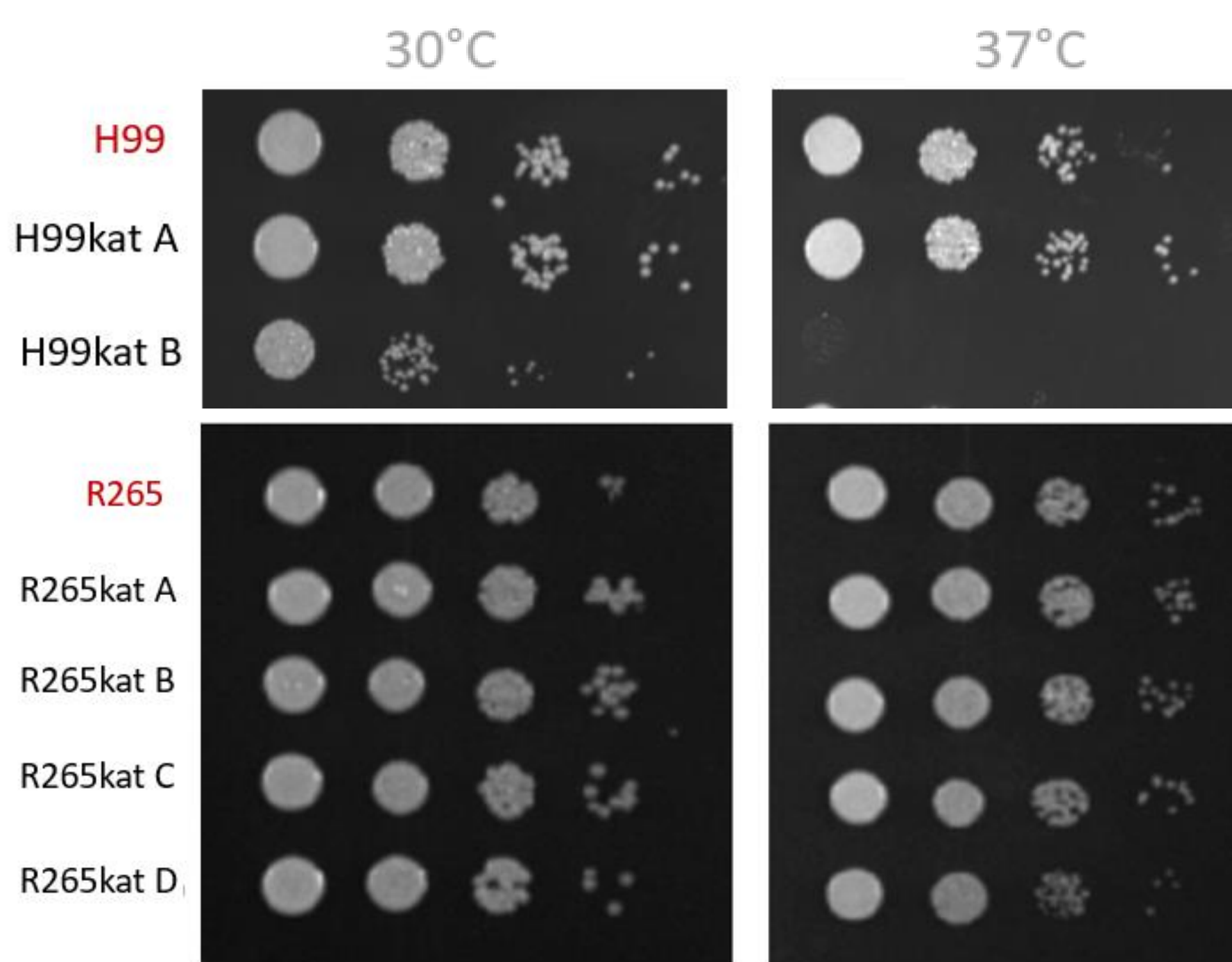


Figura 2. As linhagens fluorescentes H99kat A, H99kat B, R265kat A, R265kat B, R265kat C e R265kat D e as linhagens selvagens H99 e R265, foram cultivadas a 30°C em YPD por 48 horas. Após foram realizadas diluições seriadas em placas com YPD sólido. Estas placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. O crescimento à 37°C das linhagens R265kat A, R265kat B, R265kat C e R265kat D se mostrou similar ao da WT R265; assim como o crescimento da H99kat A foi semelhante ao da WT H99. Entretanto, a linhagem H99kat B apresentou crescimento distinto da linhagem WT H99.

BIBLIOGRAFIA

- Nosanchuk JD, Stark RE, Casadevall A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? *Front Microbiol.* 2015 Dec 22;6:1463.
Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol.* 2014;87:1-41.
Zaragoza O, Fries BC, Casadevall A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO(2). *Infect Immun.* 2003 Nov;71(11):6155-64.

2.2 Melanização

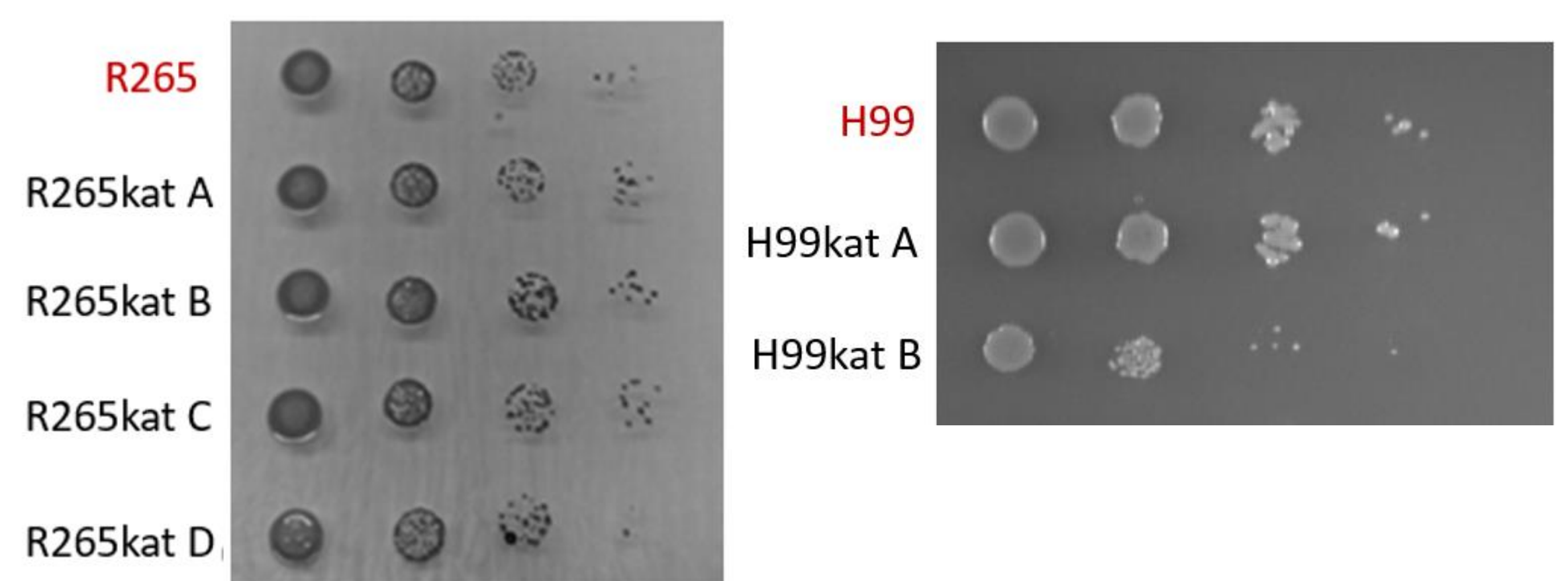


Figura 3. As linhagens WT R265, WT H99, R265kat A, R265kat B, R265kat C, R265kat D, H99kat A e H99kat B foram cultivadas a 30°C por 48 horas em ágar niger para o teste de melanização. A melanização das linhagens R265kat A, R265kat B, R265kat C, R265kat D se mostrou similar a da WT R265, da mesma forma que a melanização da linhagem H99kat A foi similar a da WT H99.

2.3 Formação da cápsula polissacarídica

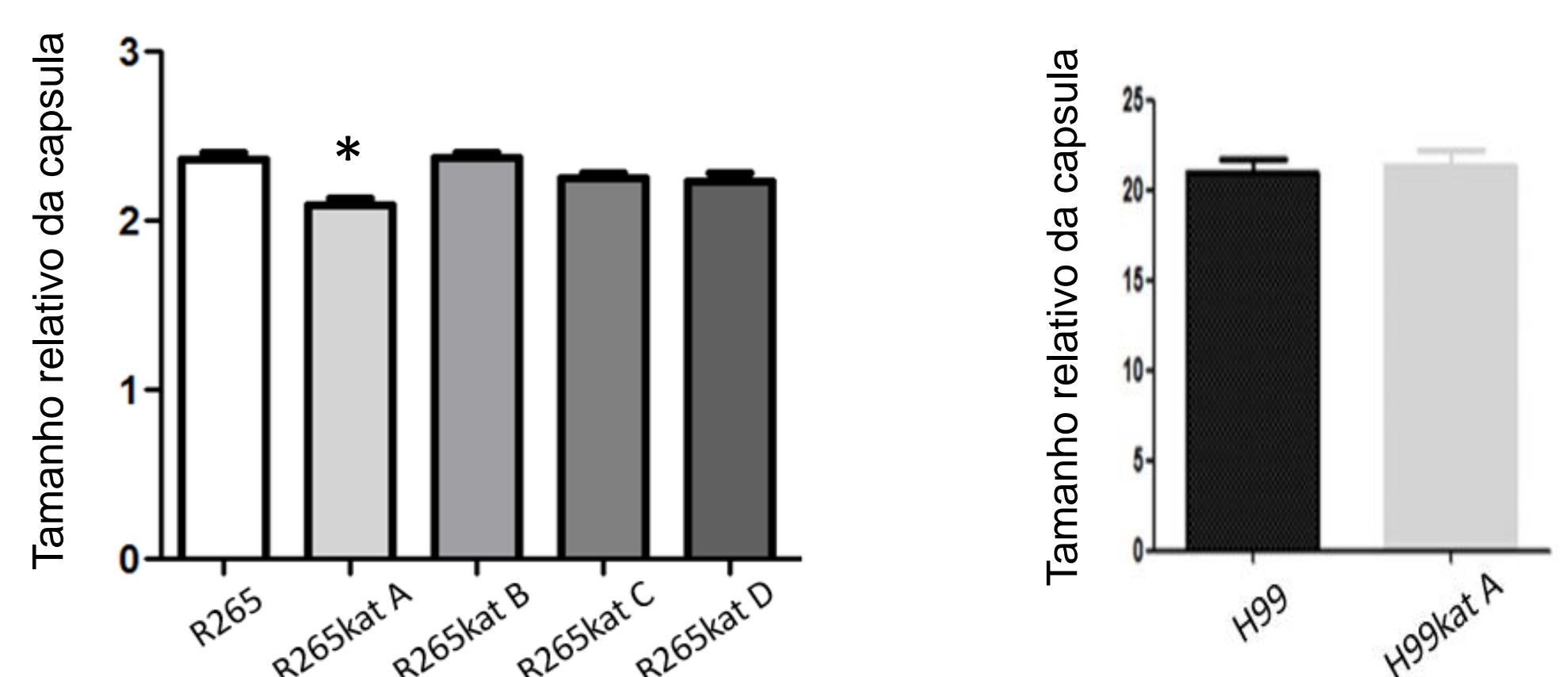


Figura 4. A Produção da cápsula polissacarídica foi realizada a partir do cultivo das linhagens WT H99, WT R265, H99kat A, R265kat A, R265kat B, R265kat C e R265kat D em meio indutor de cápsula, após foi realizada a análise da medida célula/cápsula de 100 células distintas de cada cultivo. A dimensão capsular da linhagem H99kat A é similar a linhagem WT H99, assim como a dimensão das cápsulas da R265kat B, R265kat C e R265kat D são similares a da linhagem WT R265. A linhagem R265kat A apresentou diferença significativa no tamanho da cápsula quando comparada a WT R265. * p < 0.05.

CONCLUSÃO

No presente trabalho os principais determinantes de virulência das linhagens fluorescentes de *C. gattii* e *C. neoformans* foram avaliados e comparados com as linhagens selvagens R265 e H99. De acordo com os resultados, as linhagens transformadas que apresentaram os principais fatores de virulência similares as linhagens selvagens são H99kat A, R265kat B, R265kat C, R265kat D. A emissão da fluorescência das linhagens fluorescentes de *C. gattii* será considerada para determinar qual linhagem será utilizada nos testes *in vivo*.