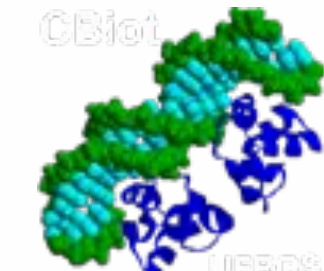




Universidade: presente!



UFRGS
PROPESQ



21. 25. OUTUBRO • CAMPUS DO VALE

XXXI SIC

DIVERSIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus gattii* DO RIO GRANDE DO SUL

Bernardo Nassau de Souza^{1,2}, Marilene Henning Vainstein²

¹Aluno de graduação em Ciências Biológicas - UFRGS; ²Centro de Biotecnologia, UFRGS

INTRODUÇÃO

A levedura *Cryptococcus gattii* é um dos agentes etiológicos da criptococose, doença que leva a óbito cerca de 180 mil pessoas por ano. *C. gattii* possui determinantes de virulência, tais como formação de biofilme, produção de urease, melanização e cápsula polissacarídica.

Diferentes linhagens de *C. gattii* podem apresentar esses determinantes de virulência expressos de maneiras distintas. Essa diversidade levou a ser adotado o termo "complexo de espécies de *Cryptococcus gattii*" para chamar a espécie (Kwon-Chung KJ et al., 2017). Caracterizar linhagens isoladas é de grande importância epidemiológica, especialmente no Brasil onde foram realizados poucos estudos com essa abordagem.

Esse trabalho propõe uma análise da diversidade de *C. gattii* isolados clínicos do Rio Grande do Sul. Assim como uma relação entre o subtipo molecular e as diferenças nos determinantes de virulência.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram isoladas linhagens de *C. gattii* de pacientes internados com criptococose em hospitais do Rio Grande do Sul. Para este trabalho utilizamos as linhagens identificadas como 3, 18, 42, 43, 142, 152, 167, 170, 179 e 180. Como padrão, utilizamos a linhagem hipervirulenta R265, responsável pela epidemia de Vancouver em 1999.

- **Multilocus Sequence Type:** Os alelos e subtipos moleculares foram identificados através do MLST database disponível em mlst.mycologylab.org/ após o sequenciamento dos genes CAP59, GPD1, IGS1, LAC1 PLB1, SOD1 e URA5.
- **Formação de Biofilme:** A formação de biofilme foi realizada utilizando o método de redução de XTT.
- **Atividade de Urease:** Cultivos realizados em meio ureia para a produção de urease.
- **Cápsula Polissacarídica:** Os isolados foram cultivados em estufa a 5% de CO₂ para indução de cápsula. As células foram fixadas e medidas em microscopia de luz por contraste negativo com tinta nanquim. O diâmetro da célula é igual ao diâmetro total subtraído a espessura da cápsula. Para cada isolado foram contadas 100 células.
- **Melanização:** Os isolados foram cultivados em ágar L-DOPA para indução da melanização.
- **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):** Foi realizada microscopia eletrônica de varredura para avaliar a ultraestrutura da cápsula polissacarídica dos isolados.
- **Curva de Sobrevivência:** Para o teste de virulência foi realizada uma curva de sobrevivência utilizando o modelo invertebrado de infecção *Galleria mellonella*.

RESULTADOS

Tabela 1: Número dos alelos e subtipos moleculares dos isolados. As linhagens 18 e 180 foram identificados como subtipo molecular 20, o mesmo da linhagem referência R265.

Strain	Alleles							ST
	CAP59	GPD1	IGS1	LAC1	PLB1	SOD1	URA5	
R265	1	1	4	4	1	14	7	20
18	1	1	4	4	1	14	7	20
42	8	6	22	4	2	87	3	182
43	8	6	22	4	2	87	3	182
142	2	35	57	4	1	104	2	309
167	2	35	57	4	1	104	2	309
170	2	35	57	4	1	104	2	309
180	1	1	4	4	1	14	7	20

Formação de Biofilme

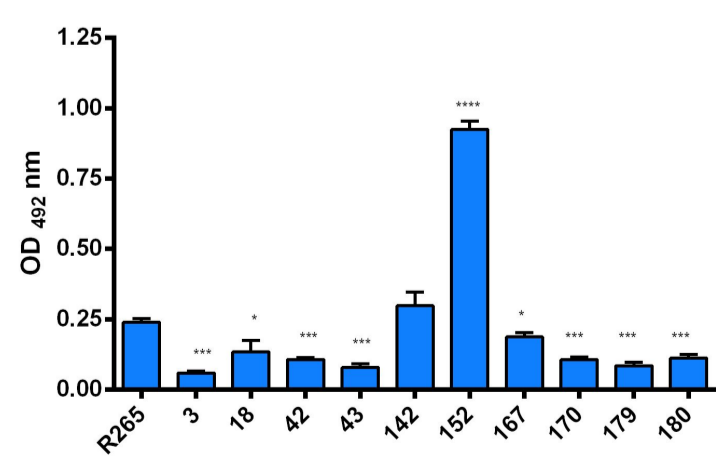


Fig. 1: Formação de biofilme dos isolados. A linhagem 152 demonstrou ser fortemente formadora de biofilme.

Atividade de Urease

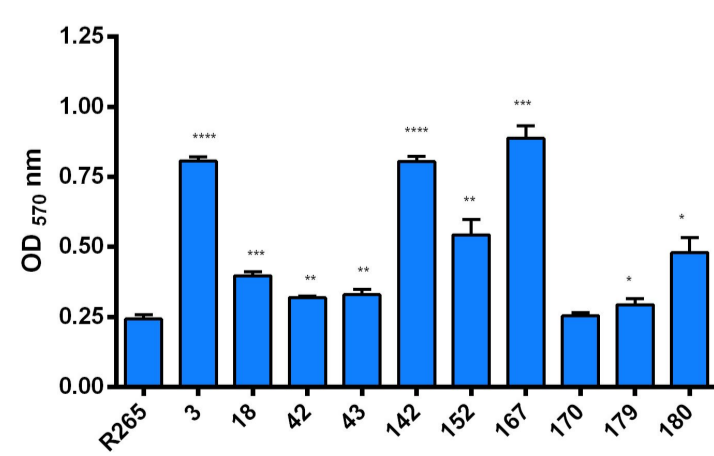


Fig. 2: Quantificação da produção de urease dos isolados.

Cápsula Polissacarídica

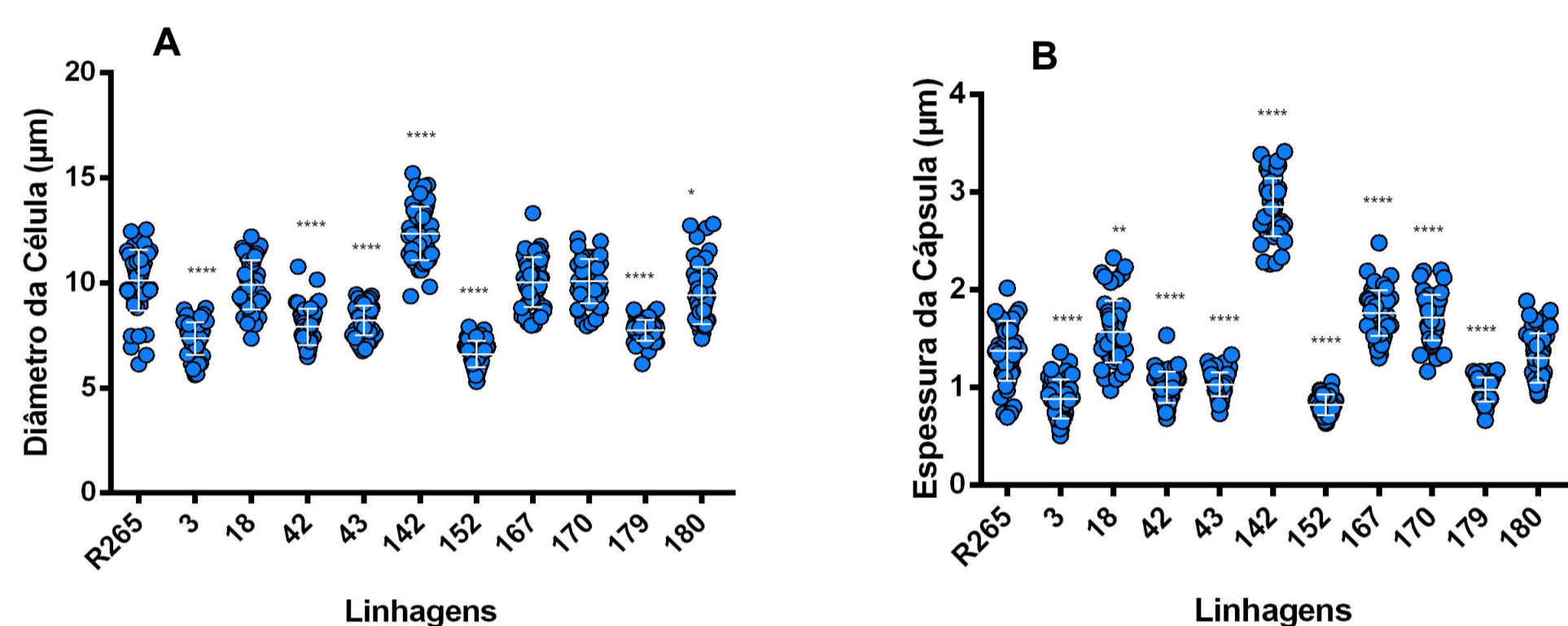


Fig. 4: Caracterização de diâmetro celular e espessura capsulares. Foram realizadas medições em 100 células de cada isolado.

Melanização

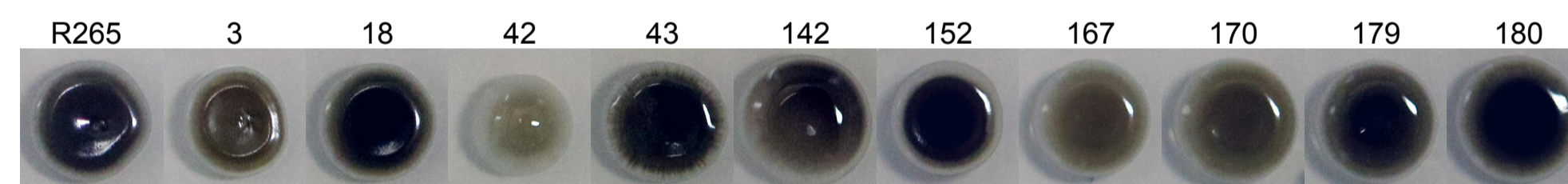


Fig. 3: Melanização dos isolados. Observou-se que as linhagens 18, 43, 152, 179 e 180 possuem padrão de melanização similar ao da linhagem R265.

Microscopia Eletrônica de Varredura

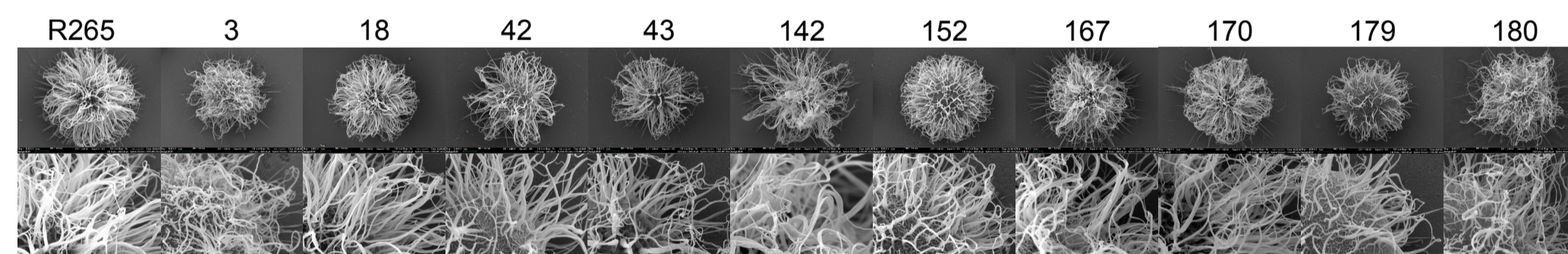


Fig. 4: Microscopia eletrônica de varredura. Ultraestrutura celular dos isolados com destaque nos detalhes das fibras da cápsula polissacarídica. Imagens com aproximação de 10 mil vezes e 30 mil vezes, respectivamente.

Curva de Sobrevivência

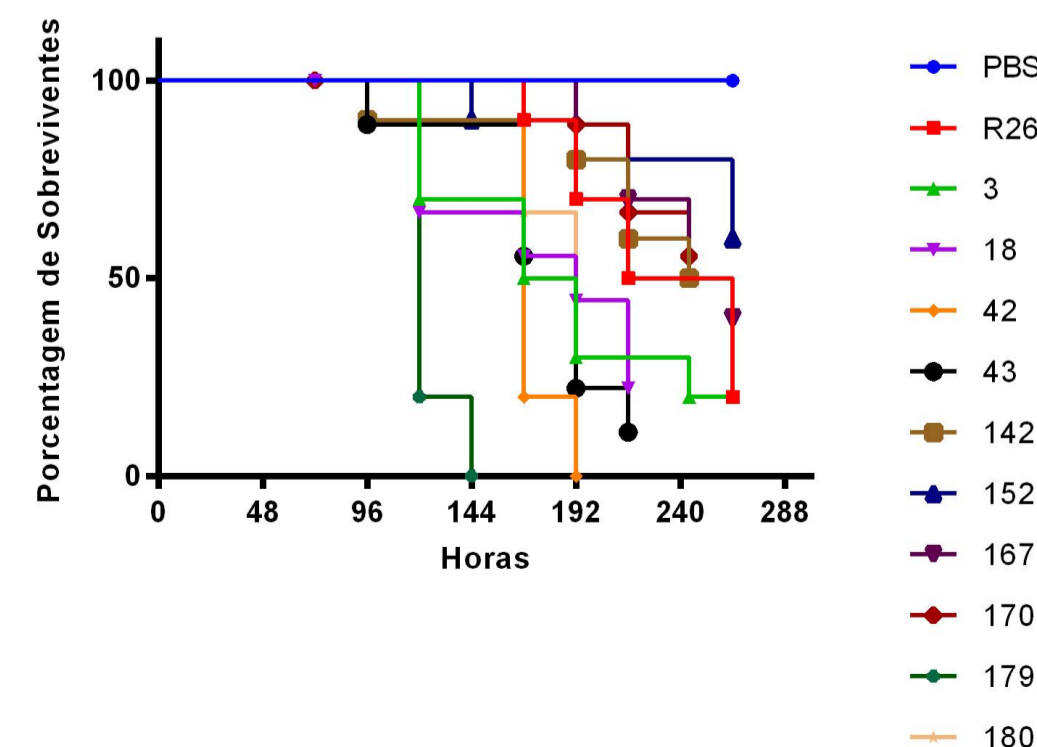


Fig. 6: Comparação da virulência dos isolados utilizando *Galleria mellonella* como modelo de infecção.

CONCLUSÕES

O estudo demonstra a diversidade molecular e fenotípica da levedura *C. gattii* através de análise dos determinantes de virulência e dos subtipos moleculares, um contexto ainda inexplorado em isolados clínicos do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS:

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, Bicanic TA, Castañeda E, Chang YC, Chen J, Cogliati M, Dromer F, Ellis D, Filler SG, Fisher MC, Harrison TS, Holland SM, Kohno S, Kronstad JW, Lazera M, Levitz SM, Lionakis MS, May RC, Ngamskulronroj P, Pappas PG, Perfect JR, Rickerts V, Sorrell TC, Walsh TJ, Williamson PR, Xu J, Zelazny AM, Casadevall A. 2017. The case for adopting the "species complex" nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere* 2:e00357-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00357-16>.