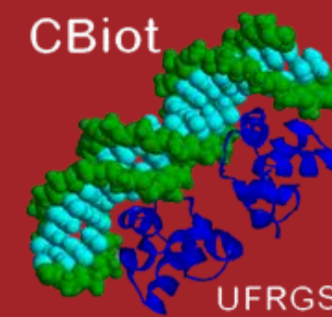


AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES COMPETITIVAS E MUTUALÍSTICAS DE ISOLADOS AMBIENTAIS COM *Cryptococcus neoformans*



Laura Haleva^{1,2}, Marilene Henning Vainstein².

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



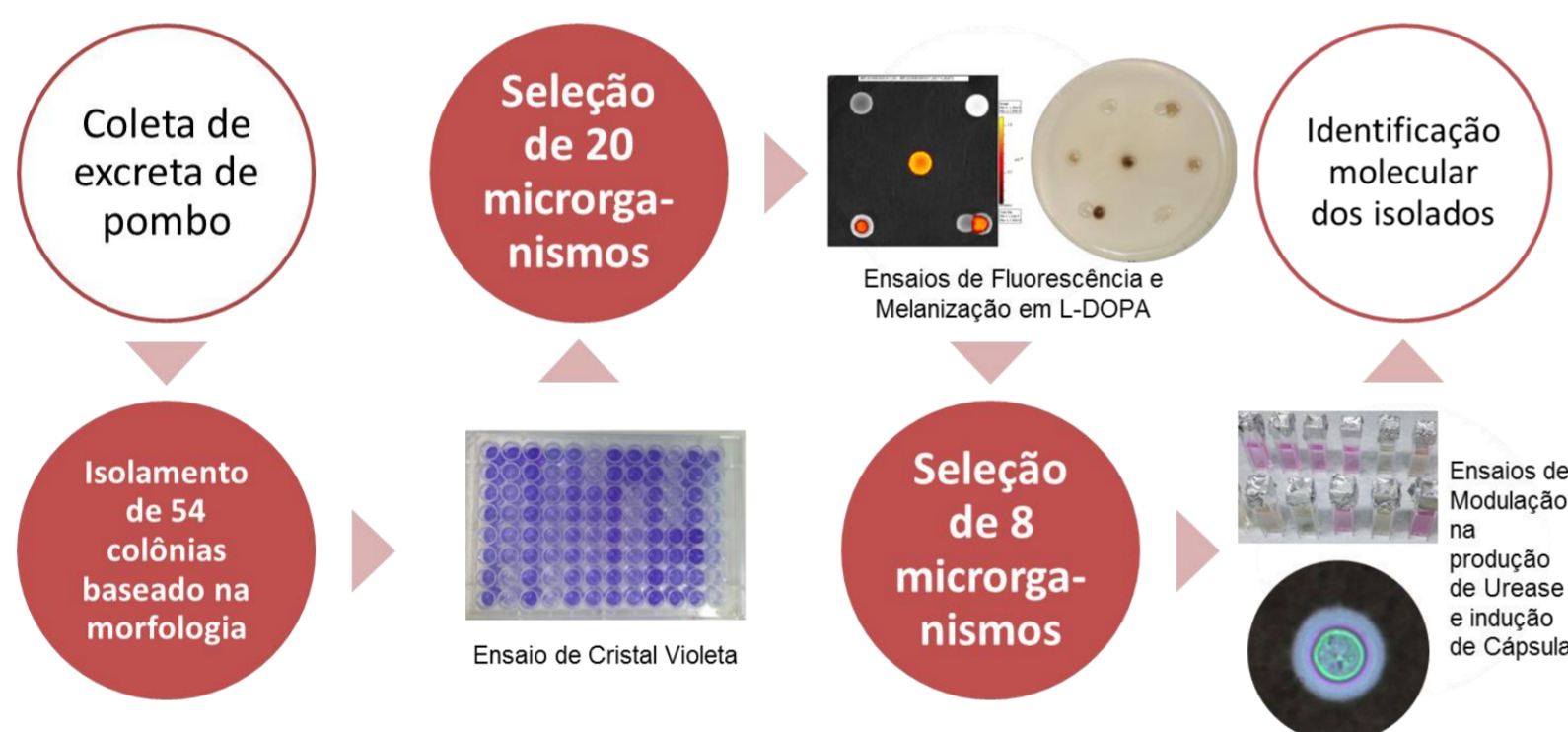
INTRODUÇÃO

Em ambientes compartilhados, microrganismos frequentemente apresentam comportamentos de mutualismo e competição por recursos limitados de espaço e nutrientes. Por consequência, algumas bactérias desenvolveram mecanismos antagônicos direcionados contra fungos patogênicos encontrados no mesmo meio. A levedura *Cryptococcus neoformans*, frequentemente identificada em excretas de pombos nos ambientes urbanos, é a principal causadora da criptococose, uma infecção letal propagada mundialmente. Para isso, esse patógeno utiliza diversos fatores de virulência como produção de cápsula polissacarídica, secreção de enzimas, melanização e formação de biofilme. Biofilmes são comunidades complexas e organizadas constituídas por fungos e bactérias, cuja estrutura é composta por uma matriz polimérica extracelular, garantindo vários benefícios para a sobrevivência. Esse trabalho tem como principal objetivo investigar a modulação de fatores de virulência decorrentes da interação entre microrganismos ambientais e *C. neoformans*.

METODOLOGIA

Linhagens: As linhagens de *C. neoformans* utilizadas foram B3501 (sorotipo D), H99 (sorotipo A) e seus mutantes fluorescentes Kat B3501 e Kat H99 (mutantes expressando o gene que codifica a proteína fluorescente vermelha Katushka).

Isolados ambientais: As amostras ambientais foram coletadas a partir de excretas de pombos próximas a hospitais e parques de Porto Alegre.



Formação de Biofilme: Para avaliar a formação de biofilme, os isolados foram cultivados individualmente ou misturados com *C. neoformans* (linhagem B3501) em microplacas empregando o ensaio de Cristal Violeta.

Influência das interações na produção de melanina: Para avaliar o efeito da interação dos isolados ambientais com *C. neoformans* (linhagem H99) quanto à melanização, foram realizados co-cultivos em meio L-DOPA. As amostras foram separadas em: isoladas, misturadas com H99 e colônias em contato nas placas.

Presença de *C. neoformans* na interação: Para analisar a presença de *C. neoformans* em co-cultivos, foram realizados ensaios com mutantes fluorescentes Kat B3501 e Kat H99. As colônias foram visualizadas por imageamento óptico (IVIS Lumina). Para a quantificação do fungo, as amostras isoladas e mistas foram incubadas em microplacas e a excitação/emissão de fluorescência foi lida em 588/635 nm (SpectraMax).

Efeito na produção de urease: Com o objetivo de avaliar o efeito das interações na produção da enzima urease em *C. neoformans* (linhagem H99), os microrganismos isolados e misturados foram suspensos em Caldo Ureia e incubados a 37°C por 4 horas. A mudança da coloração do meio de amarelo para rosa indica atividade ureolítica.

Avaliação da cápsula: Os isolados ambientais foram co-cultivados com *C. neoformans* em soro fetal bovino 10% a 30°C por 72h para a indução de cápsula polissacarídica da levedura. As células foram analisadas em microscópio óptico utilizando nanquim como contrastante.

EM ANDAMENTO

CONCLUSÕES

- Identificação molecular dos isolados;
- Teste de susceptibilidade a antifúngicos;
- Microscopia Eletrônica de Varredura.

Os dados obtidos evidenciam que as interações polimicrobianas têm relevante participação na modulação de fatores de virulência de patógenos.

RESULTADOS

INTERAÇÃO POLIMICROBIANA EM MEIO SÓLIDO

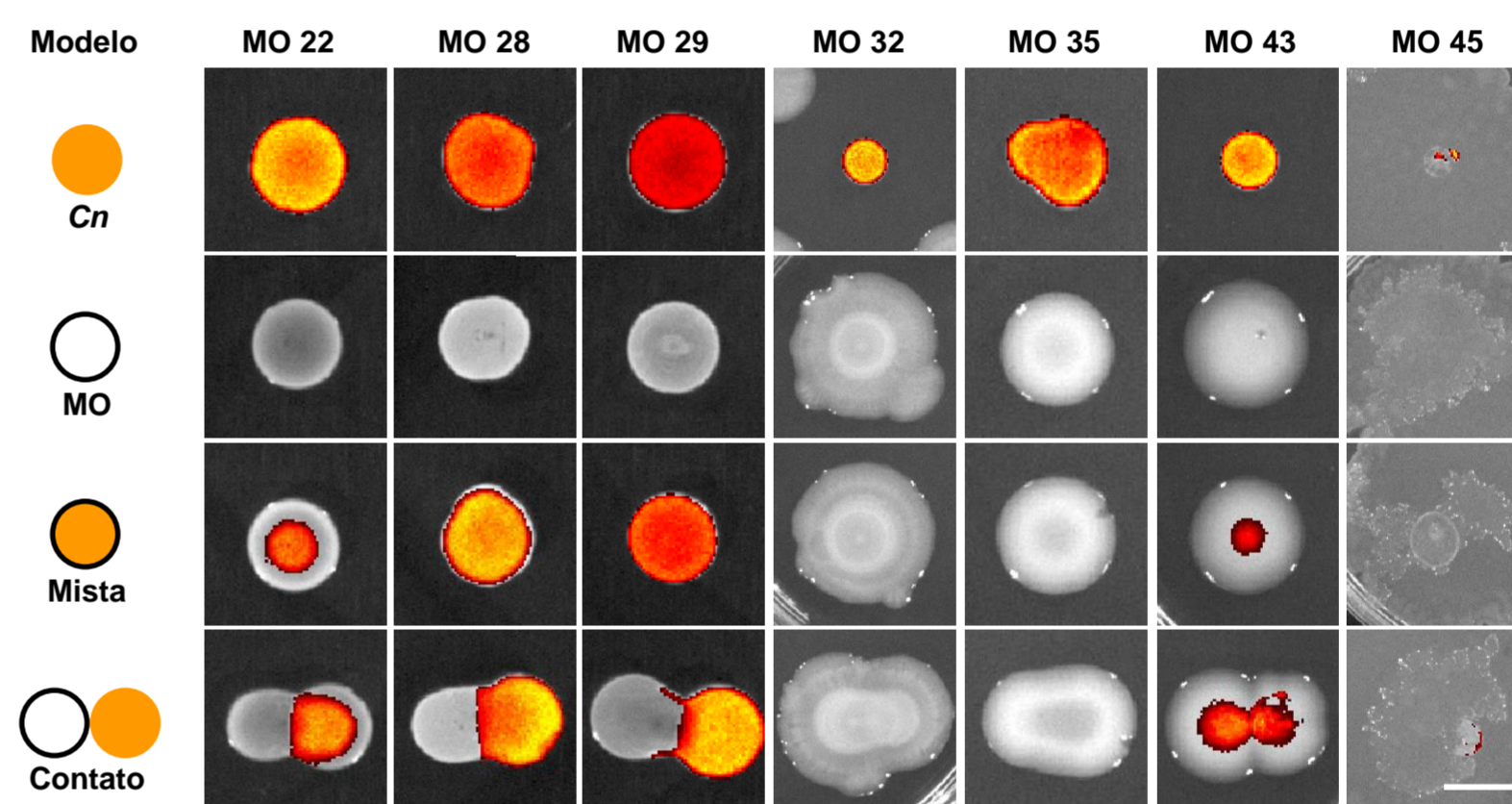


Figura 1. Visualização da presença de *C. neoformans* em colônias isoladas e mistas com microrganismos (MO) isolados de excretas de pombo utilizando mutante fluorescente Kat H99. Imagens tiradas pelo IVIS Lumina. Barra de escala 1 cm. Cn – *C. neoformans*

ATIVIDADE UREOLÍTICA

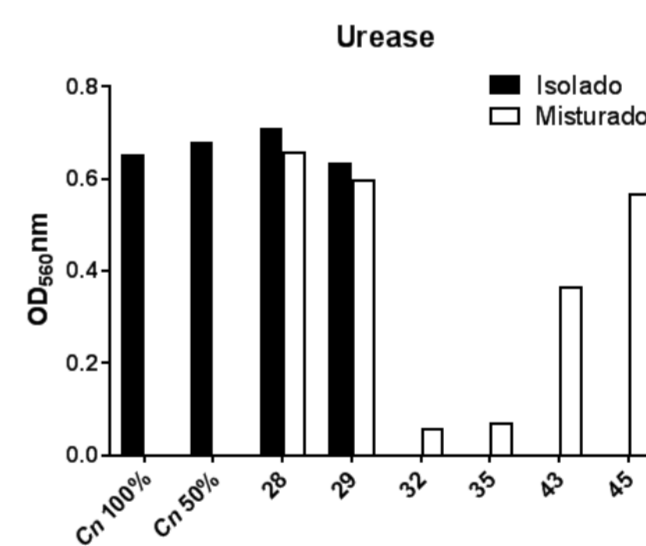


Figura 2. Quantificação da produção de urease de *C. neoformans* linhagem H99 isolado e co-cultivado (1:1) com os isolados ambientais a 37°C por 4 horas em agitação. Cn – *C. neoformans*

EFEITO NA CÁPSULA POLISSACARÍDICA DE *C. NEOFORMANS*

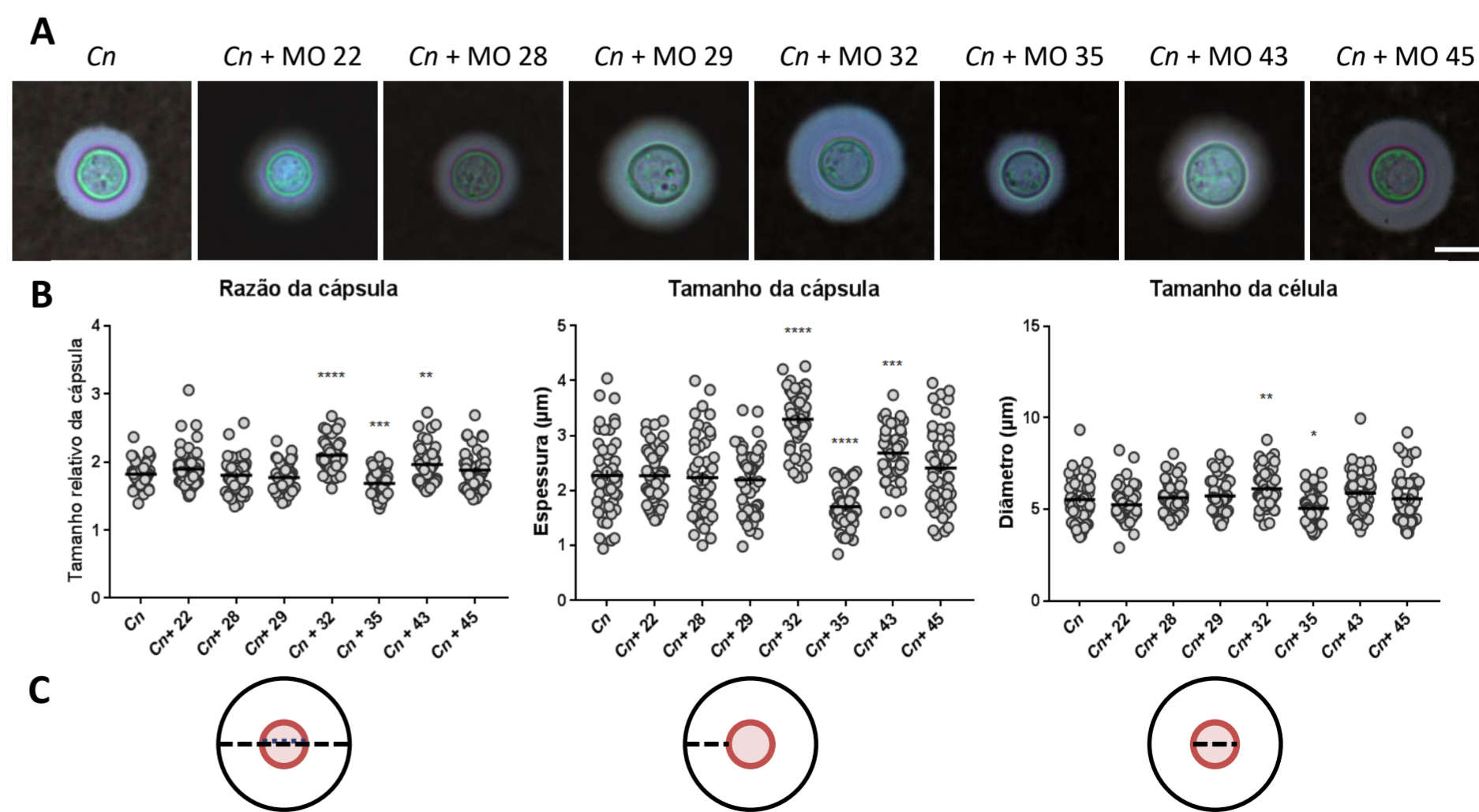


Figura 3. Produção de cápsula por *C. neoformans* linhagem H99 isolado e misturado com os isolados ambientais (MO). (A) Imagens de microscopia óptica das células de Cn H99 após terem sido co-cultivadas com os microrganismos (MO). Barra de escala 5 µm. (B) Quantificação de 50 células para cada condição. ****, P < 0.05. (C) Esquema com as mensurações.

APOIO FINANCEIRO: CAPES E CNPQ

AGRADECIMENTOS: LABORATÓRIO DE FUNGOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E BIOTECNOLÓGICA (CBIOT-UFRGS)

Referências Bibliográficas

Mayer, F. L., & Kronstad, J. W. 2017. Disarming Fungal Pathogens: *Bacillus safensis* Inhibits Virulence Factor Production and Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *MBio*,