

Introdução

Cryptococcus gattii e *Cryptococcus neoformans* são leveduras basidiomicéticas causadoras da criptococose, doença que pode ser adquirida pela via respiratória, tornando-se sistêmica podendo atingir o sistema nervoso central (Huston, S. M., et al; 2009, Clin Chest Med). Para tanto, as proteínas da parede celular estão envolvidas na adesão ao epitélio pulmonar bem como a cápsula polissacarídica, já descrita como um fator de virulência envolvido na interação patógeno-hospedeiro (Doering, T. L. 2009, Annu Rev Microbiol), podem desempenhar funções essenciais na colonização do trato respiratório. Sendo assim, este estudo tem como objetivos identificar as proteínas de parede celular de *C. neoformans* e *C. gattii* envolvidas na adesão ao epitélio pulmonar.

Resultados

Avaliação da interação entre células de *C. neoformans* e *C. gattii* a células do epitélio pulmonar.

As células leveduriformes de *C. neoformans* (linhagens selvagem H99 e mutante acapsular CAP67) e *C. gattii*, R265, foram co-cultivadas em placas de 96 poços à células do epitélio pulmonar (Linhagem A549) por diferentes tempos (1h, 2h, 4h e 8h) em meio DMEM a 37°C e 5% CO₂. Os poços foram lavados com PBS, e o sistema foi fixado com 4% de paraformaldeído. As células de *Cryptococcus sp.* foram contadas com o programa Image J.

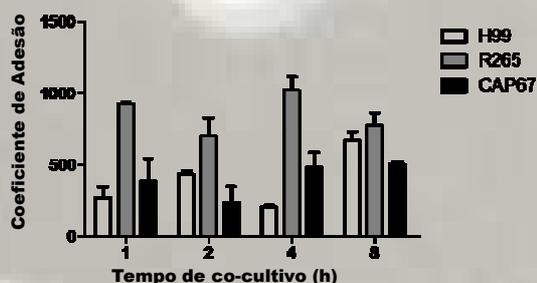


Figura 1. Avaliação da adesão de *C. neoformans* e *C. gattii* à células do epitélio pulmonar. Após fixação do sistema, cinco diferentes campos foram avaliados quanto a presença de células leveduriformes. Média de 2 experimentos independentes.

Cinética da formação de cápsula durante adesão.

O sobrenadante do experimento acima citado, foi fixado com 4% de paraformaldeído e as células leveduriformes foram visualizadas por microscopia óptica por contraste com tinta da índia.

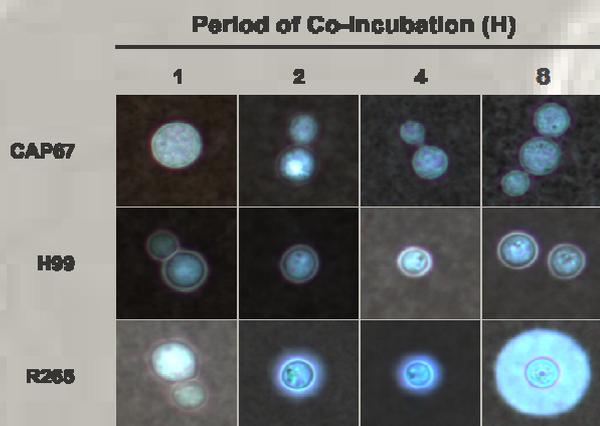


Figura 2. Síntese da cápsula dependente do tempo de incubação em *C. neoformans* e *C. gattii*. Após distintos períodos de tempo, o tamanho da cápsula foi avaliado pela coloração de células com tinta Nankim e fotografadas. Aumento de 1000x.

Teste de digestão trípica das células de *Cryptococcus sp.* para identificação de proteínas de superfície.

Com o intuito de identificar proteínas de superfície que possam estar envolvidas no processo de adesão independente da cápsula, células de *C. neoformans*, CAP67, foram tratadas diretamente com tripsina. Diferentes tempos de incubação foram avaliados (5min, 10min, 15min e 30min). Os peptídeos obtidos foram dessalinizados (Sistema OasisHLB-Waters) e analisados por espectrometria de massas (Q-TOF). O número de peptídeos identificados em cada tratamento está ilustrado na Tabela 1.

Tempo de incubação	Proteínas Identificadas	Presença de peptídeo sinal	
5 min	34 proteínas	8 proteínas	23,50%
10 min	8 proteínas	1 proteína	12,50%
15 min	21 proteínas	2 proteínas	9,50%
30 min	20 proteínas	6 proteínas	30%

Tabela 1. Proteínas identificadas em diferentes tempos de incubação direta com tripsina. A análise da espectrometria de massas, realizada pelo programa Mascot, foi comparada ao banco de dados do servidor SignalP para obtenção da porcentagem de proteínas identificadas que possuem peptídeo sinal.

Efeitos da digestão trípica em relação a viabilidade celular de células leveduriformes.

Com o intuito de avaliar se as proteínas de superfície identificadas podem estar envolvidas no processo de adesão independente de cápsula, avaliamos se o tratamento das células com tripsina pode afetar a viabilidade celular. Para tal, realizamos a incubação de 10⁸ células de *C. neoformans* (linhagens B3501A e CAP67) com diferentes concentrações de tripsina (4µg, 2µg, 1µg e 0,5µg) por 5 minutos. A viabilidade foi analisada com *Trypan Blue* 0,4% (GIBCO®), e o resultado está demonstrado na Tabela 2.

Tripsina (µg)	Linhagem	
	B3501A	CAP67
4	99,947 ± 0,015	99,867 ± 0,009
2	99,910 ± 0,006	99,840 ± 0,107
1	99,0905 ± 0,017	99,868 ± 0,063
0,5	99,892 ± 0,003	99,744 ± 0,164

Tabela 2. Análise da viabilidade celular de *C. neoformans* após digestão trípica. Após incubação, as células foram contadas em Câmara de Neubauer em diluição de 1:1 com *Trypan Blue*.

Perspectivas

- Avaliação *in vitro* da adesão de células leveduriformes previamente tratadas com tripsina;
- Confirmação da identidade das proteínas de superfície por métodos alternativos de isolamento de proteínas.
- Conclusão do estudo sobre cinética de formação de cápsula com a linhagem B3501A.
- Construção do mutante acapsular para *Cryptococcus gattii*.
- Inoculação de células leveduriformes digeridas trípica para estudos *in vivo*.

Apoio