

TÍTULO: OBTENÇÃO DE MORFOTIPOS VIRULENTOS DE *CRYPTOCOCCUS* SPP. E SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

AUTORES: SERAFIM, L.; DE JESUS, D. F. F.; ISHIDA, K.

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (RUA PROFESSOR LINEU PRESTES 1374, 05508-000, SÃO PAULO/SP, BRASIL)

RESUMO:

Dentre os fatores de virulência de *Cryptococcus* spp. responsáveis pelo sucesso da infecção e disseminação, destacam-se o aumento da sua cápsula mucopolissacarídica e a formação de células titãs. Ambos os fatores são responsáveis por conferir proteção aos fungos contra a fagocitose, dificultando a ação dos mecanismos imunológicos do hospedeiro e dos antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose. Com isso, o presente estudo tem como objetivo obter os morfotipos de *Cryptococcus* spp. *in vitro* bem como avaliar a sensibilidade aos antifúngicos. As leveduras de tamanho normal foram obtidas em caldo Sabouraud dextrose (CSD) por 72 h a 35 °C, sem agitação. Para obtenção de células com cápsula aumentada, leveduras de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 foram cultivadas em líquido cefalorraquidiano artificial (LCR) por 72h a 35 °C sem agitação. Para obtenção de células titãs as leveduras previamente cultivadas, por 24h, em meio YNB, foram lavadas e transferidas para um meio contendo PBS, 5% de soro fetal bovino e 5% de caldo Sabouraud e incubadas em microaerofilia por 72 h, sob agitação a 150 rpm. Após o período de incubação as células foram coradas com tinta nanquim para medição da espessura da cápsula e do diâmetro corporal. As leveduras de ambas as cepas cultivadas em LCR apresentaram maior espessura de cápsula (5,750µm para *C. neoformans* e 5,405µm para *C. gattii*) quando comparadas com as leveduras cultivadas apenas em CSD (1,716µm para *C. neoformans* e 2,721µm para *C. gattii*). Em relação a indução de células titãs foi observado que 11% das células medidas de *C. neoformans* e 58% de *C. gattii* apresentaram característica de titãs, cujo diâmetro corporal seja $\geq 10\mu\text{m}$, ademais, havia presença de células normais e células com cápsula espessa, fato que mimetiza o comportamento infeccioso de *Cryptococcus* spp. Para determinação da sensibilidade de células titãs e de cápsula aumentada aos antifúngicos padrão fluconazol (FLC) e anfotericina B (AMB) foi utilizado o método de microdiluição em caldo (documento CLSI M27-A4) e foi verificado que ambos os morfotipos de *C. neoformans* e *C. gattii* testados foram sensíveis aos antifúngicos. Os valores de concentração inibitória mínima da AMB variaram entre 0,03 e 0,06µg/ml e do FLC variaram entre 2 e 16 ug/ml, valores estes similares aqueles obtido sobre as leveduras de tamanho normal (AMB = 0,03µg/ml e FLC = 1 e 4µg/ml). A partir desses dados, foi demonstrado que os meios utilizados foram capazes de induzir células titãs e com cápsula espessa, e que ambos os morfotipos de *Cryptococcus* spp. são sensíveis aos antifúngicos AMB e FLC atualmente adotados na terapia da criptococose.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptococcus*, morfotipos, antifúngicos, células titãs, cápsula, virulência

AUXÍLIO FINANCEIRO: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 405556/2018-7)