

GEOMETRIA COESIVA DA DISTRIBUIÇÃO DE *Cryptococcus neoformans* PROMOVE A FORMAÇÃO DE BIOFILME FLOWER-LIKE

William Lopes^{1,2}, Marilene Henning Vainstein².

¹ Faculdade de Farmácia - UFRGS; ² Centro de Biotecnologia, UFRGS.

INTRODUÇÃO

A levedura patogênica *Cryptococcus neoformans* é a principal causa de mortalidade por meningoencefalite, acarretando em mais de 200.000 mortes por ano. Essa levedura apresenta cápsula, a qual favorece adesão em superfícies e formação de biofilme. Micro-organismos em biofilmes correspondem a 80% das infecções recalcitrantes aos tratamentos convencionais e ao sistema de defesa do hospedeiro, principalmente devido ao revestimento por uma matriz extracelular. Biofilmes formados por *C. neoformans* podem ser encontrados associados a dispositivos médicos e ao tecido nervoso na forma de criptococomas. Apesar da compreensão acerca da complexidade de biofilmes, pouco se sabe sobre os fatores envolvidos na dinâmica da sua formação e compreensão da sua ultraestrutura.

Nesse contexto, esse trabalho utilizou uma nova abordagem para caracterizar a distribuição geométrica das células de *C. neoformans* durante o estágio inicial da formação de biofilme.

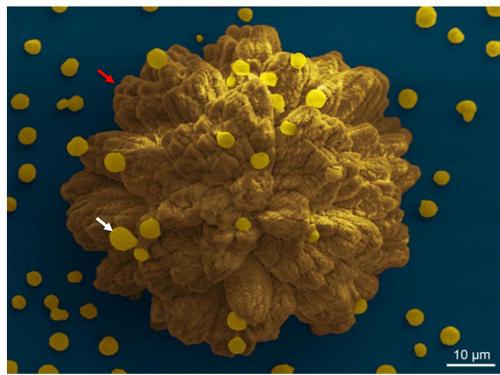


Figura 1 : Microscopia eletrônica de varredura de biofilme formado por *Cryptococcus neoformans*. Células (seta em amarela) matriz (seta em vermelha)
Imagens: William Lopes

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens: As seguintes linhagens de *C. neoformans* foram utilizadas: B3501 e H99 (selvagens), *grasp* (mutante hipocapsular) e *cap67* (mutante acapsular).

Formação e quantificação de biofilme: Para formação de biofilme, as células foram cultivadas (sob lamínulas de vidro em microplacas de 24 poços) em meio de cultivo mínimo por 48 h a 37 ° C. Após as etapas finais de lavagens, adicionou-se a solução de XTT em cada poço. As microplacas foram incubadas a 37°C por 5h. A mudança de cor decorrente da metabolização do XTT até o derivado formazan foi medida utilizando leitor de microplacas (SpectraMax i3x) em 492nm.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): O preparo das amostras foi realizado aplicando-se um novo protocolo desenvolvido para a visualização de células criptocócicas. De forma geral, a preparação das amostras seguiu as etapas: fixação, pós-fixação, desidratação, secagem em ponto crítico e metalização. Posteriormente foram visualizadas no microscópio EVO-MA10.

Análise matemática: Afim de caracterizar a distribuição geométrica das células de *C. neoformans* durante o estágio inicial da formação de biofilme, as análises foram realizadas empregando-se modelos matemáticos (triangulação de Delaunay e diagrama de Voronoi). Foram utilizadas imagens de MEV de mutantes acapsular, hipocapsular e selvagem.

$$\text{Triangulação de Delaunay: } \psi_6^i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \cos(6\theta_j)$$

RESULTADOS

MEV das linhagens de *C. neoformans* durante o estágio inicial da formação de biofilme. As linhagens selvagens B3501 e H99 apresentaram diferenças na organização celular e quantidade de células aderidas. Estas linhagens foram selecionadas para os estudos subsequentes.

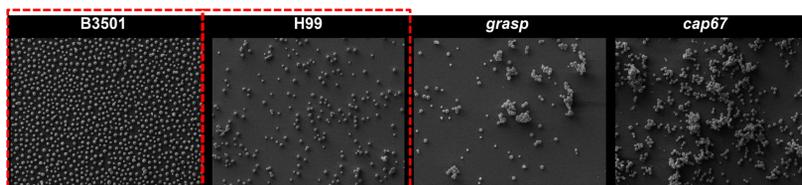


Figura 2 : MEV das linhagens de *C. neoformans* durante o estágio inicial da formação de biofilme. B3501 e H99 (selvagens), *grasp* (mutante hipocapsular) e *cap67* (mutante acapsular).

Análise da organização celular e correlação com a formação de biofilme.

As linhagens selvagens B3501 e H99 foram selecionadas para análise comparativa. Pode-se observar que a linhagem B3501 apresenta-se mais organizada (Fig. 3A) e ordenada de forma hexagonal (Fig. 3B-C). O valor de ψ_6 próximo a 1 indica um hexágono perfeito.

É possível estabelecer correlação entre formação de biofilme e organização celular. Células em maior ordenação hexagonal formam mais biofilme (Fig. 4).

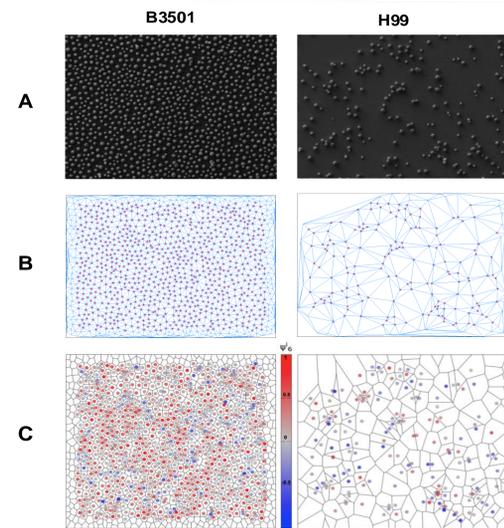


Figura 3 : Análise comparativa. (A) MEV de células aderidas. (B) Triangulação de Delaunay - rede de células aderidas. (C) Diagrama de Voronoi para os valores de ψ_6 .

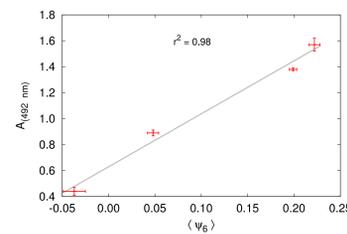


Figura 4 : Correlação entre organização celular (ψ_6) e formação de biofilme. A linhagem B3501 apresentou maiores valores de ψ_6 e formação de biofilme em comparação com a linhagem H99. PLL: Substrato de adesão celular Poli-L-Lisina.

	<i>C. neoformans</i> strains			
	B3501		H99	
	$\langle \psi_6 \rangle$	A (492 nm)	$\langle \psi_6 \rangle$	A (492 nm)
Without PLL	0.20	1.38	-0.04	0.44
With PLL	0.22	1.57	0.05	0.89

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE BIOFILME

A linhagem B3501 foi selecionada para análise ultraestrutural de biofilme (Fig. 5-6).

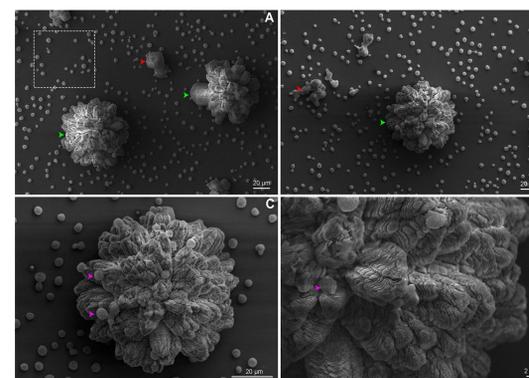


Figura 5. Clusters *flower-like*, constituídos por células incorporadas em uma camada densa de matriz. Seta vermelha: microcolônia; seta verde: biofilme maduro; seta rosa: células.

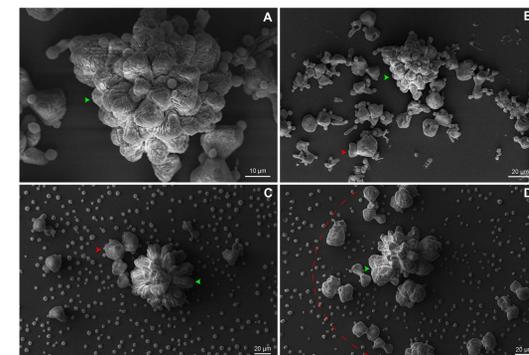


Figura 6. Diferentes níveis de organização espacial: células aderidas, clusters de células e comunidade de clusters aparentemente regulados de forma parácrina. Seta vermelha: microcolônia; seta verde: biofilme maduro; seta rosa: células.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos destacam o potencial da organização celular como alvo para inibição da formação de biofilme. Os resultados comprovam a possibilidade em utilizar uma medida numérica para quantificar a ordem geométrica de células aderidas. As análises ultraestruturais revelam a complexidade e organização de biofilmes maduros formados por *C. neoformans*.

*Dados de time-lapse (não apresentados no pôster) indicam que *C. neoformans* apresenta motilidade mediada pela organização hexagonal das células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Martinez, L. R., and A. Casadevall. 2006. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother*
Martinez, L. R., and A. Casadevall. 2015. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology Spectrum*