

FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Papiliotrema flavescens* ISOLADO DE POMBOS *Columba livia*

CAROLINA DOS SANTOS BERMANN¹; CAROLINE QUINTANA BRAGA²;
AUGUSTO DUARTE BROD²; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – carolbermann@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Micoses oportunistas, causadas por fungos de baixa virulência, afetam principalmente indivíduos imunocomprometidos e têm se tornado prevalentes ao longo dos anos (PARK et al., 2016). A criptococose, uma micose emergente, é causada principalmente pelos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, embora outras espécies oportunistas de fungos também possam estar envolvidas (ZHANG et al., 2022).

Papiliotrema flavescens (previamente *Cryptococcus flavescens*) é uma espécie não-*Cryptococcus neoformans*/não-*gattii*, reclassificada por LIU et al. (2015). Já foi relatado em infecção coexistente com adenocarcinoma primário pulmonar (ZHANG et al., 2022) e meningite em paciente soropositivo para HIV (KORDOSSIS et al., 1998), além de abscessos subcutâneos em canino (KANO et al., 2012).

Recentemente, *P. flavescens* foi isolado a partir de cérebro, pulmão e intestino de pombos hígidos capturados na zona urbana do município de Pelotas/RS/Brasil e foi identificado fatores de virulência, incluindo presença de cápsula e termotolerância (BERMANN et al., 2022), o que motivou o prosseguimento de estudos com esse espécime fúngico.

Os fatores de virulência do gênero *Cryptococcus* já são bem estudados e definidos, entre eles a presença de cápsula, produção de melanina, termotolerância e urease (KUMARI et al., 2024). Esses fatores são responsáveis pela sobrevivência do fungo no ambiente e no hospedeiro, propiciando a disseminação e resistência ao sistema imunológico dos hospedeiros (FEDER et al., 2015). Contudo, estudos quanto os fatores de virulência de outras espécies de Tremellomycetes são escassos e em um estudo publicado por OLIVEIRA et al. (2021) foi demonstrado que podem apresentar diferenças importantes no potencial patogênico quando comparadas ao complexo *C. neoformans* e complexo *C. gattii*, incluindo uma maior resistência a agentes antifúngicos.

Com o aumento do número de infecções por espécies de *Cryptococcus não-neoformans*/não-*gatti* em humanos e animais, que inclui espécies de Tremellomycetes, torna-se relevante analisar a capacidade de expressar fatores de virulência entre isolados de *Papiliotrema flavescens* oriundas de órgãos de pombos.

2. METODOLOGIA

As amostras avaliadas neste estudo (n=5) foram previamente isoladas de cérebro, pulmão e intestino de pombos *Columba livia* capturados na cidade de Pelotas/RS/Brasil e identificadas por análise molecular como *Papiliotrema*

flavescens. Os isolados fúngicos foram mantidos em tubos com ágar Sabouraud dextrose e armazenados em refrigeração no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas (LABMICO- UFPel).

Os isolados foram repicados e cultivados em ágar níger a 30°C e avaliados em dois momentos distintos quanto a produção de melanina. O primeiro momento foi analisado macroscopicamente após 10 dias de incubação para identificação de colônias amarronzadas ou enegrecidas. Após esse período, as amostras foram submetidas a temperatura de 5°C por até 60 dias para avaliação de uma possível alteração na coloração mediada pelo estresse térmico (OLIVEIRA et al., 2021). Como controle positivo foi utilizada uma cepa previamente identificada de *C. neoformans*. A produção de melanina foi pontuada em quatro scores de coloração baseados em PEDROSO et al. (2009): 0 (zero) sem pigmento; 1 castanho claro; 2 castanho; 3 castanho escuro; 4 próximo ao preto.

A atividade de urease foi identificada pela inoculação em tubos de ensaio contendo ágar ureia de Christensen preparado conforme a técnica descrita por KURTZMAN et al. (2011), utilizando como controle positivo uma cepa de *Cryptococcus neoformans*. As amostras testadas foram repicadas no meio e incubadas a 25°C, com acompanhamento diário por até quatro dias. Durante esse período, as amostras consideradas positivas para produção de urease são capazes de catalisar a ureia, alterando sua coloração para rosa intenso.

Para avaliação da produção de hemolisina foi utilizada a metodologia de LUO et al. (2001) adaptada por OLIVEIRA et al. (2021). Os isolados avaliados foram cultivados em caldo Sabouraud overnight e dez microlitros dessa suspensão foram semeados em duplicata em ágar Sabouraud-dextrose (SDA) contendo 7% de sangue de carneiro e 3% de glicose e incubadas a 37°C/ 48 horas em atmosfera de 5% CO₂. A leitura da hemólise foi feita pela formação de halo claro ao redor das colônias.

Os resultados foram planilhados em Microsoft Excel® para comparação dos fatores de virulência entre os isolados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que dos isolados avaliados, apenas um (1/5) não foi capaz de produzir coloração acastanhada em ágar níger, indicando que nesta colônia não houve produção de melanina mesmo após o período estipulado em temperatura de geladeira, portanto considerada score zero. As demais amostras (4/5) foram classificadas em score 1 por serem fracas produtoras de melanina, não manifestando a coloração acastanhada completa na colônia, mas em formas de raias de melanização. Dessa forma, foram consideradas capazes de produzir melanina de forma discreta quando comparadas ao controle de *C. neoformans* (score 4). Ainda foi possível notar que duas amostras (2/5) desenvolveram mais melanização com o tempo em estresse térmico, chegando ao score 2.

A produção de melanina está diretamente envolvida à invasão hematoencefálica, visto que o fungo utiliza as catecolaminas para expressão desse fator de virulência (BAKER et al., 2022). Além disso, a melanina está associada à evasão do sistema imunológico do hospedeiro (AL-HUTHAIFI et al., 2024), logo, a melanização das colônias era algo esperado nesse estudo, tanto nas amostras que tiveram tropismo pelo cérebro quanto as que ficaram alojadas nos pulmões. O tempo de incubação em estresse térmico foi um estudo primeiramente observacional das amostras, mas segundo KUMARI et al. (2024), assim como na forma ambiental o fungo utiliza da melanina para proteção contra raios UV, pode

utilizar o pigmento como defesa em baixas temperaturas devido ao estresse térmico causado nas células.

Quanto a atividade de urease, quatro (4/5) amostras alteraram a coloração do meio ágar para rosa intenso sinalizando a catalisação da ureia, enquanto uma amostra (1/5) não sofreu alteração. A atividade de urease foi presente em todas as amostras provenientes de cérebro e pulmão, órgãos estes que possuem barreiras imunológicas mais complexas e que dificultam o alojamento desses micro-organismos e ausente na amostra isolada de intestino. A urease é responsável pela evasão do sistema imunológico, persistência e disseminação no hospedeiro (FEDER et al., 2015) e a expressão dessa enzima em grande parte dos isolados de *P. flavescens* corrobora os resultados avaliados por SÁNCHEZ et al. (2008) em amostras de *C. neoformans*.

Nenhum dos isolados testados (0/5) demonstrou capacidade de produzir hemólise, característica observada em algumas espécies de *Cryptococcus* mais patogênicas, conforme observado no estudo de OLIVEIRA et al. (2021). Por ser um fator de patogenicidade responsável pela liberação de ferro através da destruição da fração heme da hemoglobina, está relacionado à sobrevivência e capacidade de infecção no hospedeiro (LUO et al., 2001). Essa característica, entretanto, não é relatada em espécies oportunistas como *P. flavescens*.

Curiosamente, a amostra proveniente de intestino foi única a não demonstrar os fatores de virulência esperados. Isso pode ser explicado pela possibilidade de não estar causando infecção no animal, mas sim, fazendo sua passagem pelo trato digestivo como é esperado pelo papel dos *Columba livia* na disseminação e enriquecimento do solo através das fezes contendo *Cryptococcus* (BERMANN et al., 2022).

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *P. flavescens* isoladas de cérebro e pulmão de pombos *Columba livia* foram capazes de expressar fatores de virulência importantes para um fungo oportunista, como produção de melanina e urease, porém não expressaram hemólise. Além disso, a amostra de intestino não expressou nenhum fator de virulência testado no presente estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HUTHAIFI, A. M.; RADMAN, B. A.; AL-ALAWI, A. A.; MAHMOOD, F.; LIU, T. B. Mechanisms and Virulence Factors of *Cryptococcus neoformans* Dissemination to the Central Nervous System. **J Fungi (Basel)**, v.10, n.8, p.586, 2024.

BAKER, R. P.; LIU, A. Z.; CASADEVALL, A. Cell wall melanin impedes growth of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule by sequestering calcium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.121, n.38, p.e2412534121, 2024.

BERMANN, C.D.S; BRAGA, C.Q.; SILVEIRA, J.S.; MILECH, A.; DOS SANTOS, C.C.; IANISKI, L.B.; MACIEL, A.F.; BROD, A.D.; WEIBLEN, C.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B. Tremellomycetes isolated from organs of *Columba livia*. **Med Mycol.** v.60, n.12, myac93, 2022.

FEDER, V.; KMETZSCH, L.; STAATS, C.C.; VIDAL-FIGUEIREDO, N.; LIGABUE-BRAUN, R.; CARLINI, C.R.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **FEBS J**, v.282, p.1406-1418, 2015.

KANO, R.; ISHIDA, R.; NAKANE, S.; SEKIGUCHI, M.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. The first reported case of canine subcutaneous *Cryptococcus flavescens* infection. **Mycopathologia**, v.173, n.2-3, p.179-182, 2012.

KORDOSSIS, T.; AVLAMI, A.; VELEGRAKI, A.; STEFANOY, I.; GEORGAKOPOULOS, G.; PAPALAMBROU, C.; LEGAKIS, N.J. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. **Med. Mycol.**, v.36, p.335–339, 1998.

KUMARI, D.; SACHIVKINA, N.; PASRIJA, R. Investigation of the influence of pH and temperature on melanization and survival under oxidative stress in *Cryptococcus neoformans*. **Arch Microbiol**, v.206, n.355, 2024.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. **In The yeasts**, v.5, p. 87-110, 2011.

LIU, X. Z.; WANG, Q. M.; GÖKER, M.; GROENEWALD, M.; KACHALKIN, A. V.; LUMBSCH, H. T.; MILLANES, A. M.; WEDIN, M.; YURKOV, A. M.; BOEKHOUT, T.; BAI, F. Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in mycology**, v.81, p.85–147, 2015.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Candida Species Exhibit Differential In Vitro Hemolytic Activities. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n. 8, p.2971–2974, 2001.

OLIVEIRA, L.S.S; PINTO, L.M; DE MEDEIROS, M.A.P; TOFFALETTI, D.L; TENOR, J.L; BARROS, T.F; NEVES, R.P; NETO, R.G.L; MILAN, E.P; PADOVAN, A.C.B; ROCHA, W.P.D.S; PERFECT, J.R; CHAVES, G.M. Comparison of *Cryptococcus gattii/neoformans* Species Complex to Related Genera (*Papiliotrema* and *Naganishia*) Reveal Variances in Virulence Associated Factors and Antifungal Susceptibility. **Front Cell Infect Microbiol**, v.11, p.642658, 2021.

PARK, J.; CHO, S.; YOUN, S.; BAK, Y.; YU, Y.; KIM, Y.K. Epidemiological Characterization of Opportunistic Mycoses between the Years 2006 and 2010 in Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 145-150, 2016. SÁNCHEZ, A.; ESCANDÓN, P.; CASTAÑEDA, E. In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. **Rev Iberoam Micol**, v.25, n.3, p.145–149, 2008.

ZHANG, S.; WANG, L.; HAN, Q.; SUN, A.; LIU, X.; XUE, L. Lung cancer coexisting with *Papiliotrema flavescens* infection diagnosed by next-generation sequencing: a case report. **BMC Infect Dis**, v.22, n.1, p.684, 2022.