

MATURAÇÃO DE BIOFILME E DISPERSÃO CELULAR DE UMA CEPA DO COMPLEXO *Fusarium solani* SOBRE CATETER VENOSO

Alana Fernanda Luzia Salvador^a (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Flavia Franco Veiga^b, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski^{a,b} (Co-orientador), Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi^{a,b} (Orientador) e-mail: mfnnggrassi2@uem.br

^aDepartamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

Ciências Biológicas/ Microbiologia/ Micologia

Palavras-chave: *Fusarium solani*, biofilme, dispositivo médico.

Resumo:

As espécies pertencentes ao complexo *Fusarium solani* possuem alta capacidade de causar patogenicidade agindo de forma oportunista. Este trabalho teve o intuito de avaliar a cinética da formação de biofilmes em cateter venoso, focando em maturação e dispersão ao longo do tempo (24, 48, 72 e 96 horas), pelos métodos de enumeração do número de fungos cultiváveis em unidades formadoras de colônia (UFC), biomassa do biofilme total e atividade metabólica mitocondrial (ensaio de redução). A avaliação do biofilme realizada entre o período de 24 horas a 48 horas demonstrou que o biofilme estava em período de crescimento com aumento dos parâmetros avaliados. A maturação passou a ser considerada entre 48 horas e 72 horas, onde o crescimento se manteve estável para UFC e biomassa total. Já a dispersão ocorreu a partir de 72 horas a 96 horas, quando houve diminuição dos parâmetros avaliados UFC, biomassa total e atividade metabólica mitocondrial. Assim, conclui-se que o biofilme formado se matura em 48h e a partir de 72h começa a dispersar-se, podendo organizar-se e formar um novo biofilme.

Introdução

Fusarium spp. é um fungo filamentosos anemófilo, amplamente encontrado no solo, água e ar, que apresenta em sua micromorfologia hifas septadas hialinas. Em humanos, *Fusarium* spp. é responsável por diversas doenças, desde micoses cutâneas até infecções sistêmicas. Essas infecções disseminadas causadas por esse fungo apresentam altas taxas de mortalidade, em pacientes imunocomprometidos variando entre 50% a 70% (NUCCI, 2007).

Variados fatores de virulência são utilizados por microrganismos como estratégias para resistir ao sistema imunológico do hospedeiro e causar infecção. Dentre os fatores de virulência dos fungos, a formação de

biofilme tem grande importância na patogênese das infecções fúngicas. O biofilme se inicia com a adesão do fungo a um substrato, então as células proliferam e subsequente a formação de hifas. Com o biofilme em desenvolvimento aumentando a biomassa forma-se a matriz extracelular que o envolve e com isso o biofilme está maturado. Após ocorre a dispersão, onde as células filhas se desprendem do biofilme com uma tendência de maior virulência (BLANKENSHIP, 2006).

Esse arranjo auxilia o patógeno em alguns aspectos, como na elevada capacidade de adesão às superfícies, sobrevivência em condições adversas, resistência aos antimicrobianos e potencialização de fatores de virulência, uma vez que, a dispersão de células maduras de biofilme estão associadas a infecções fúngicas com fenótipo de resistência a medicamentos e maior virulência desses organismos (BRUNKE, 2016). Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar biofilmes formados por uma cepa pertencente ao complexo *Fusarium solani* em cateter venoso.

Materiais e métodos

Isolado

O estudo foi realizado com uma espécie pertencente ao complexo *Fusarium solani* ATCC 36031, mantida na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá a temperatura de -80 °C. O fungo foi reativado em caldo Sabouraud e após o crescimento, foi confirmado a identificação por meio das características macroscópicas e microscópicas. Para cada teste, foi realizado uma cultura em ágar batata (PDA) por 5 dias a 25 °C. Após o crescimento, a cultura foi raspada e os conídios de *F. solani* foram recolhidos em solução salina a 0,8% e filtrados para eliminar a presença de hifas. A viabilidade dos conídios foi determinada com azul de Trypan (0,4%) em câmara de Neubauer e a concentração do inóculo determinada de acordo com cada experimento.

Capacidade de formação de biofilme

Foi realizada em placa de poliestireno de 96 poços com fragmentos de cateter venoso cortados assepticamente no tamanho de 0,5 cm e incubando um inóculo de 1×10^7 de conídios/mL a 37 °C por 24, 48, 72 e 96 horas. O biofilme foi avaliado em termos de: enumeração do número de fungos cultiváveis em unidades formadoras de colônia (UFC); biomassa do biofilme total usando o tradicional método de coloração de cristal violeta (CV) e atividade metabólica mitocondrial (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilide) ensaio de redução (XTT).

Resultados e Discussão

A avaliação do biofilme realizada entre o período de 24 horas a 48 horas demonstrou que o biofilme estava em período de crescimento, onde as UFC foram crescentes, a biomassa total e a atividade metabólica mitocondrial também (Tabela1).

A maturação passou a ser considerada entre 48 horas e 72 horas, onde o crescimento se manteve estável para UFC (de 0,50 para 0,52 Log₁₀/cm²) e biomassa total (de 0,03 para 0,04 Abs/cm²), exceto a atividade metabólica que já iniciou um declínio no período apresentado (de 0,06 para 0,02 Abs/cm²). Esse aumento da quantidade de biomassa pode ser caracterizado pela formação de hifas, o que é importante para a formação robusta de biofilme de fungos filamentosos (BLANKENSHIP, 2006).

Já a dispersão ocorreu a partir de 72 horas a 96 horas, quando houve diminuição dos parâmetros avaliados: UFC de 0,52 para 0,33 Log₁₀/cm²; biomassa total de 0,04 para 0,01 Abs/cm². A atividade metabólica mitocondrial seguiu decaindo de 0,02 para 0,01 Abs/cm². Os valores do ensaio de redução XTT no presente estudo diminuíram com o tempo, sugerindo redução na atividade metabólica dos biofilmes. Esse resultado corrobora com de outros autores, onde os biofilmes de *Fusarium* exibem cinética oposta a atividade metabólica. Esta baixa atividade metabólica pode ser devida ao aumento da adsorção de compostos no biofilme matriz, significando que há menos contato entre o sal de tetrazólio e as células de biofilme maduro (GALLETTI, 2017).

É provável que vários processos-chave desempenhem papéis vitais nesses diferentes estágios de desenvolvimento do biofilme, como aderência de células-substrato e células-células, desenvolvimento de hifas e detecção de comunicação do biofilme.

Tabela 1. Avaliação das atividades para uma espécie do complexo *Fusarium solani* ao longo do tempo.

	UFC (Log ₁₀ /cm ²)	CV (Abs/cm ²)	XTT (Abs/cm ²)
24h	0,48	0,02	0,04
48h	0,50	0,03	0,06
72h	0,52	0,04	0,02
96h	0,33	0,01	0,01

UFC: unidade formadora de colônia; CV: método de cristal de violeta para avaliar a biomassa total; XTT: método para avaliar a atividade celular; abs: absorbância.

Conclusões

De acordo com os objetivos propostos ao trabalho, avaliação da cinética do biofilme de *F. solani*, conforme os resultados apresentados, é possível afirmar que esta espécie é capaz de formar biofilme em cateter venoso, o

mesmo se matura e, após se dispersa, o que pode causar um agravamento da infecção.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá, ao laboratório de Micologia Médica por todo o suporte para o projeto, à Professora Melyssa Negri, minha orientadora, por todo o apoio e disposição, à Flávia Veiga por estar sempre acompanhando e auxiliando.

Referências

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology* 2006; 9(6): 588-594.

BRUNKE, S. *et al.* Virulence factors in fungal pathogens of man. *Current Opinion in Microbiology* 2016; 32:89–95.

GALLETTI, J. *et al.* Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. *Future microbiology* 2017 12(14): 1311-1321.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(4): 695-704.

OTTER, J. A. *et al.* Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *Journal of Hospital Infection* 2015; 89(1):16-2.