

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR DE BIOFILME DE *FUSARIUM OXYSPORUM*

Ana Beatriz Godoi (PIBIC/FA/UEM), Deisiany Gomes Ferreira (Co-orientadora), Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi (Orientadora). E-mail: mnegri@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea: Ciências da saúde /Medicina

Palavras-chave: *Fusarium* spp.; matriz extracelular; virulência

RESUMO

O objetivo foi caracterizar a matriz do biofilme de *Fusarium oxysporum* e avaliar sua virulência. Foi realizado o biofilme de *F. oxysporum* (CMRP 2925), na sequência a matriz de cada tempo de biofilme (24h, 48h, 72h, 96h e 120h) foi extraída e armazenamos a -20 °C. Foi quantificando eDNA, eRNA e proteínas totais, avaliado a ação sobre *Candida albicans*, citotoxicidade em células de mamífero e patogenicidade em larvas de *Tenebrio molitor*. Foi observado uma variação entre os componentes de matriz, mas aumento de produção em 48h, com exceção do eRNA. A matriz não apresentou efeito sobre o crescimento em *C. albicans*. Entretanto, as células de mamífero em contato com a matriz apresentaram redução significativa da atividade celular e as larvas morreram, especialmente no grupo em contato com a matriz de 48h. Assim, observamos que a matriz do biofilme de *F. oxysporum* apresenta toxicidade sobre as células e as larvas.

INTRODUÇÃO

F. oxysporum é um fungo filamentosamente disperso no ambiente, oportunista, ou seja, capaz de causar oncomicoses e infecções sistêmicas em indivíduos imunocomprometidos. Estudos demonstram que *F. oxysporum* apresenta diversos fatores de virulência, dentre eles, a capacidade de se organizar em biofilme (Veiga *et al.*, 2022). Os biofilmes são comunidades organizadas de microrganismos, envoltas em uma matriz polimérica extracelular. A matriz é de grande importância para a sobrevivência do fungo, pois confere comunicação, proteção, adesão, entre outros fatores, dificultando sua remoção e tratamento. Os biofilmes se formam em superfícies bióticas e abióticas de difícil acesso, como próteses e cateteres, importantes focos de infecção (Ramage *et al.*, 2012). A fim de ampliar os conhecimentos a respeito dessa substância, o presente estudo objetivou caracterizar

e observar os efeitos da matriz isolada, por métodos *in vivo* e *in vitro*, para avaliar sua virulência.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolado

Este estudo foi devidamente cadastrado no SISGEN sob número A603BF2. Para este estudo foi utilizado o fungo *Fusarium oxysporum* que se encontra depositado nas Coleções Microbianas do Paraná (CMRP 2925), isolado paciente com onicomicose fusarial.

Formação do biofilme e obtenção da matriz extracelular

A formação do biofilme e extração da matriz extracelular foram feitas de acordo com o protocolo descrito em Veiga *et al.* (2022), adaptado. Preparamos um inóculo de $3,0 \times 10^6$ conídios/mL e incubamos em uma placa de 24 poços por 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. A cada 24h o poço foi lavado, raspado o biofilme e obtido a matriz por filtração. A matriz de cada tempo foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até cada experimento.

Caracterização da composição da matriz

Caracterizamos os componentes da matriz extracelular por densidade óptica (DO) utilizando o equipamento espectrofotômetro Nanodrop 2000TM (UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Realizamos a quantificação de eDNA, eRNA e proteínas totais em duplicata.

Teste da matriz extracelular em Candida albicans

Testamos os efeitos da matriz extracelular sobre *C. albicans* (ATCC 90028) de acordo com o protocolo CLSI modificado. Em cada poço, foi adicionado metade de volume do inóculo e metade de matriz extracelular. A placa foi mantida em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, após esse período, realizamos a técnica de CFM (concentração fungicida mínima) e adicionamos resazurina para evidenciar o crescimento.

Avaliação da citotoxicidade em células Vero e em larvas de Tenebrio molitor

Para a o teste *in vitro*, utilizamos células de rim de macaco, Vero (ATCC® CCL-81™), de acordo com Kischkel *et al.* (2020). Ajustamos a concentração para 2×10^5 células/mL, depois, adicionamos em uma placa de 96 poços. Após 24 horas,

adicionamos as matrizes de diferentes tempos na cultura celular e incubamos por mais 24 horas. Após esse período, foi adicionado vermelho neutro e incubado por 3 horas e realizado a leitura em espectrofotômetro (SpectraMax® Plus 384, Molecular Devices, San José, CA, EUA) a 540 nm. Foi calculada a viabilidade celular de cada tempo de matriz em duplicata. Como teste *in vivo*, fizemos a infecção de cada tempo de matriz nas larvas de *Tenebrio molitor* de acordo com o protocolo descrito em Jarros *et al.* (2020). Cada grupo continha 10 larvas, que foram separadas conforme o tempo de maturação da matriz (24h, 48h, 72h, 96h e 120h) e 1 controle. As larvas foram inoculadas com 10 µL da matriz e o grupo controle com 10 µL de PBS. As larvas foram mantidas sob dieta de criação a 25 °C durante 7 dias. A cada 24 horas observamos as características físicas e a morte das larvas. Realizamos esse teste em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a caracterização da matriz, houve um pico de produção dos componentes no período de 48 horas que decaíram, com exceção do eRNA e voltaram a subir no em 120 horas (Figura 1A). Esses dados divergem de Veiga *et al.* (2022) onde eDNA e eRNA reduziram em 48h, enquanto as proteínas se mantiveram estáveis. Essa diferença pode ser explicada pela formação do biofilme em deferentes superfícies, abiótica no presente estudo e biótica no estudo por Veiga *et al.* (2022).

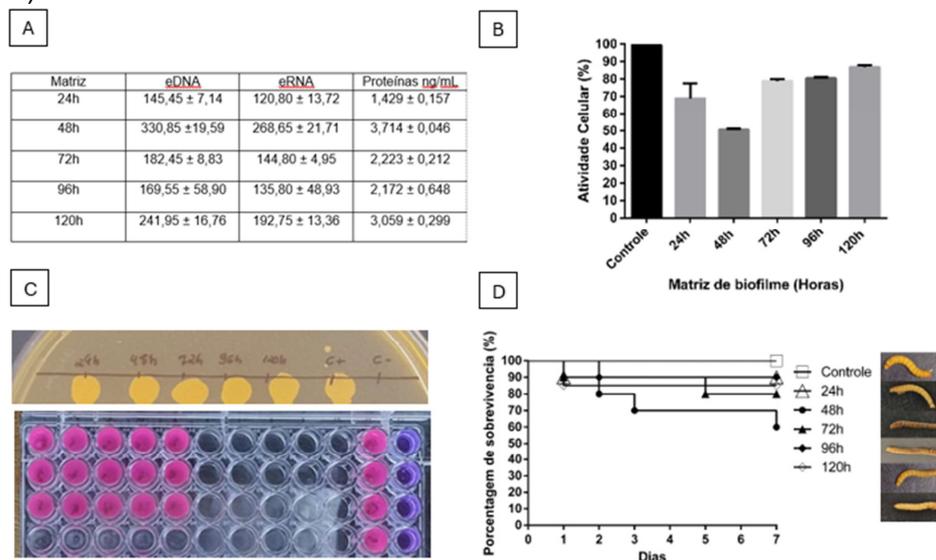


Figura 1. Resultados com a matriz extracelular de biofilme de *Fusarium oxysporum*. A) Quantificação da matriz. B) Citotoxicidade em células Vero. C) Efeito sobre *Candida albicans*. D) Curva de sobrevivência das larvas e figura representativa da diferença de características morfológicas

De acordo com Veiga *et al.* (2023) há na matriz do biofilme de *F. oxysporum* componentes que podem exercer alguma ação sobre o fungo ou hospedeiro. Apesar de não observar efeito da matriz em *C. albicans* (Figura 1C), verifica-se que a matriz apresentou redução significativa da atividade celular, especialmente no grupo de células Vero em contato com a matriz de 48h (Figura 1B). Na Figura 1D, observa-se danos causados nas larvas pela matriz. O grupo inoculado com a matriz de 48 horas apresentou mais danos, com redução da resposta após estímulo, enegrecimento e mais quantidade de larvas mortas. Observou-se uma maior frequência de mortes até o 3º dia e estabilização após o 5º dia.

CONCLUSÕES

É evidente que a matriz, principalmente após 48h de maturação, é constituída por uma maior quantidade dos compostos (eDNA, eRNA e proteínas) e que apresenta maior virulência quando comparada aos outros tempos, expressando efeitos tóxicos nas células Vero e nas larvas de *Tenebrio molitor*.

AGRADECIMENTOS

Universidade Estadual de Maringá, grupo de pesquisa OneMyco e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

JARROS, I. C. *et al.* Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 687, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290102/>>. Acesso em: 24 ago. 2024

KISCHKEL, B. *et al.* Silver nanoparticles stabilized with Propolis show reduced toxicity and potential activity against fungal infections. **Future microbiology**, v. 15, n. 7, p. 521–539, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32476467/>>. Acesso em: 24 ago. 2024.

RAMAGE, G. *et al.* Fungal biofilm resistance. **International journal of microbiology**, v. 2012, p. 1–14, 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2012/528521>>. Acesso em: 24 ago. 2024.

VEIGA, F. F. *et al.* Characterization of a biofilm formed by *Fusarium oxysporum* on the human nails. **International journal of dermatology**, v. 61, n. 2, p. 191–198,

2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijd.15747>>. Acesso em: 24 ago. 2024.

VEIGA, F. F. *et al.* Detection of 2-ethyl-1-hexanol and its modulating effect in biofilm of *Fusarium oxysporum*. **Molecular microbiology**, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38038143/1>. Acesso em: 27 ago. 2024.