

MOLÉCULA DE *quorum sensing* RELACIONADA À BIOFILME DE *fusarium* sp., UMA AVALIAÇÃO IN VITRO FRENTE A DIFERENTES ESPÉCIES FÚNGICAS

Joana Gomes Vieira (PIBIC/CNPq), Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi (Orientadora), Emilli Karini Marcomini e Pamela Tymniak. E-mail: ra124094@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina (DAB), Maringá, PR

Área e subárea: Ciências Biológicas/Microbiologia/Micologia

Palavras-chave: 2-etil-1-hexanol; antibiofilme; *Fusarium* sp.

RESUMO

A comunicação célula a célula, no interior do biofilme, ocorre por moléculas de quorum sensing (MQS), responsáveis por controlar comportamentos de virulência, patogenicidade e modular etapas de estruturação do biofilme. Entretanto, estudos sobre essas moléculas em fungos são muito recentes. Considerando que diferentes gêneros fúngicos formam biofilme, especialmente em superfícies de ambiente hospitalar, e a necessidade de novas estratégias para inibir ou erradicar infecções e biofilmes fúngicos, a avaliação de MQS como potencial agente antifúngico e antibiofilme se faz necessário. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito da MQS 2-Etil-1-Hexanol, relacionada à biofilme de *Fusarium* sp., frente a *Fusarium* spp. *Aspergillus* sp. e *Candida* spp. Foram realizados os testes de susceptibilidade antifúngica, curva de cinética de crescimento e atividade antibiofilme para *C. albicans*. 2EH foi capaz de inibir o crescimento de todos os isolados testados apresentando uma característica fungicida. Além disso, foi possível observar o comportamento de 2EH frente a *C. albicans* em uma concentração “sub-CIM” e a molécula apresentou atividade antibiofilme contra *C. albicans*. Assim, este trabalho contribuiu para reforçar a importância das MQS como possíveis agentes antifúngicos.

INTRODUÇÃO

Os biofilmes são uma comunidade de microrganismos envolvidos por uma matriz extracelular constituída de proteínas, lipídios, sacarídeos, água, minerais e material genético. A formação de um biofilme é um fator de virulência e patogenicidade para o microrganismo, pois propicia adesão, resistência, proteção, nutrição e favorece a comunicação celular, a qual é realizada através de moléculas de *quorum sensing* (MQS), responsáveis por modular o metabolismo, morfogênese, proliferação e maturação do biofilme (Santos *et al.*, 2018). Farnesol, foi a primeira MQS fúngica

identificada em *Candida albicans*, na qual pode-se avaliar tais propriedades (Polke *et al.*, 2017). Assim, as MQS são estudadas como potenciais agentes antifúngicos e antibiofilmes, como elucidado em pesquisas anteriores utilizando outras MQS, como o farnesol, tirosol e triptofol (Mehmood *et al.*, 2019). Infecções fúngicas estão, cada vez mais, sendo relacionadas a formação de biofilmes, principalmente quando se diz respeito a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), as quais elevam taxas de internações e morbimortalidade dos pacientes, uma vez que há uma dificuldade no tratamento dessas infecções (Assefa *et al.*, 2022). Dessa forma, é necessário a pesquisa de novos agentes antifúngicos que, também, apresentem atividade antibiofilme (Barreto *et al.*, 2020). Veiga e colaboradores (2023), relatam a detecção da molécula 2-Etil-1-Hexanol (2-EH), uma MQS de *F. oxysporum* que apresentou atividade fungicida contra células planctônicas de *F. oxysporum*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi de avaliar, *in vitro*, se 2-EH apresenta atividade antifúngica frente *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *A. fumigatus* e ainda avaliar a cinética de crescimento e atividade antibiofilme para *C. albicans*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados

Para este estudo foram utilizados um total de sei isolados, quatro provenientes da Rede de Coleções Microbiológicas Paranaense (CMRP-Taxonline) e três da *American Type Culture Collection* (ATCC). *Candida albicans* (ATCC 90028), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. glabrata* (ATCC 2001), *F. solani* (CMRP 5665), *F. oxysporum* (CMRP 2925) e *A. fumigatus* (CMRP 5666).

Molécula de de quorum sensing (MQS) 2-Etil-1-Hexanol (2-EH)

Para este estudo a MQS 2-EH foi adquirida comercialmente (Sigma-Aldrich® 538051) para os testes subsequentes a molécula foi diluída em água destilada variando numa concentração de 65,115 g/mol a 0,127 g/mol.

Teste de susceptibilidade antifúngica

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, em placas de 96 poços, conforme (CLSI M27-A2, 2008) frente aos isolados *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *A. fumigatus*. Foram realizados controles positivos e controles negativos. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada após 48 horas por meio da transferência de 10 µL do conteúdo dos poços para uma placa contendo Dextrose Ágar Sabouraud (SDA). A CFM foi definida como a menor concentração em que não houve crescimento do fungo. Já, a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi realizada por meio de diluições seriadas

pela transferência de 100 µL de cada concentração do ensaio CIM em contato com 900 µL de solução salina, posteriormente 20 µL desta mistura foram transferidos para uma placa de SDA na forma de gota. Realizou-se a leitura em até 24 horas e os resultados foram apresentados como UFC/ml.

Curva de cinética de crescimento para C. albicans

Inicialmente a levedura foi subcultivada em SDA e o inóculo ajustado para 5×10^5 leveduras/ml. Em seguida, a cepa foi cultivada na presença da molécula em uma concentração sub-CIM (duas vezes abaixo da CIM). As suspensões de teste foram colocadas em um agitador e incubadas a 37 °C. Nos pontos de tempo predeterminados (0 h, 15 min, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 20, 24, 30, 36 e 48 h), diluições seriadas foram realizadas em SDA para determinação de UFCs.

Atividade antibiofilme para Candida albicans

Suspensões celulares foram preparadas e adicionadas em placas de poliestireno de 96 poços, incubados a 37 °C em um agitador a 120 rpm/min por 2 h, para permitir a fixação de células à superfície abiótica. As células não aderidas foram removidas por lavagem com PBS estéril. A molécula foi adicionada após fase de adesão (2 h). Incubou-se as placas à 37 °C por 24 h.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A MQS 2-Etil-1-Hexanol apresentou uma CIM e CFM de 8,138 g/mol para *F. solani* e *A. fumigatus*, e de 4,069 g/mol para *F. oxysporum*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Observa-se que a CIM e CFM coincidem em ambos os fungos. Além disso, de acordo com os resultados obtidos por UFC, a molécula 2-EH foi fungicida para todos os fungos. Entretanto, a concentração da molécula capaz de reduzir mais de 80% do crescimento fúngico foi espécie-dependente.

A influência de 2-EH na concentração sub-CIM (2,035 g/mol) para a cinética de crescimento de *C. albicans* permitiu observar o comportamento de 2-EH frente ao fungo e pode-se analisar que, a molécula, mesmo em uma concentração abaixo da CIM, apresentou atividade inibitória no crescimento fúngico, o qual, foi diminuído, principalmente entre as 8 e 30 h de incubação, quando comparado com o controle não tratado. Ademais, 2-EH apresentou atividade antibiofilme para *C. albicans* nas concentrações “4xCIM” (8,139 g/mol) e “2XCIM” (16,278 g/mol), no qual se observou uma inibição de mais de 90%, em comparação ao controle não tratado.

Desse modo, 2-EH apresentou resultados que se assemelham a outros trabalhos, como o de Veiga *et al.* (2023), no qual a molécula apresentou atividade antifúngica e antibiofilme para *F. oxysporum*, bem como o estudo de Polke *et al.* (2017), o qual demonstrou que o Farnesol, outra MQS, apresentou atividade antifúngica contra diferentes espécies fúngicas e antibiofilme contra *Candida* spp.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a MQS 2-EH apresentou potencial inibitório e fungicida para células plantônicas das espécies fúngicas testadas. Além disso, constatou-se que a molécula foi capaz de inibir a formação do biofilme de *C. albicans*. E foi possível observar, ainda, que na concentração “sub-CIM” a molécula apresentou uma diminuição do crescimento do fungo em mais de 90%. Dessa forma, este estudo foi um dos pioneiros na demonstração da molécula 2-EH frente a diferentes espécies fúngicas e contribuiu para reforçar a importância das MQS como possíveis agentes antifúngicos.

AGRADECIMENTOS

Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e ao Grupo de Pesquisa OneMyco.

REFERÊNCIAS

ASSEFA, M.; AMARE, A. Biofilm-associated multi-drug resistance in hospital-acquired infections: A review. **Infection and drug resistance**, v. 15, p. 5061–5068, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36068834/>. Acesso em: 27 agosto 2024.

LOHSE, M. B. *et al.* Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature reviews. Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19–31, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.107>. Acesso em: 27 agosto 2024.

MEHMOOD, A. *et al.* Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review. **Molecules**, v. 24, n 10, p 1950, Mai. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/10/1950>. Acesso em: 27 agosto 2024.

POLKE, M. *et al.* Farnesol signalling in *Candida albicans* – more than just communication. **Critical Reviews in Microbiology**, Jena, Alemanha, v. 44, p. 230-243, Mai 2017. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2017.1337711>. Acesso em 29 agosto 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://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.15194>. Acesso em: 27 agosto 2024.