

# METABÓLITO PRODUZIDO POR FUNGO *Fusarium oxysporum* INIBE A CÁPSULA E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Cryptococcus* spp.

William Lopes<sup>1,2</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Aluno de graduação em Farmácia - UFRGS; <sup>2</sup> Centro de Biotecnologia, UFRGS.



## INTRODUÇÃO

As leveduras patogênicas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os agentes causadores da criptococose, uma infecção que acomete o sistema nervoso central, ocasionando meningite. Essas leveduras encapsuladas podem se desenvolver na forma de biofilmes aderidos a superfícies abióticas. Micro-organismos em biofilmes podem causar infecções difíceis de tratar, devido ao revestimento que protege as células da ação de antifúngicos ou do sistema imunológico do paciente. Biofilmes de *Cryptococcus* spp. podem estar associados a válvulas cerebrais, tubos de derivação (*shunts*) utilizados para drenar o excesso de líquido e também associados a outros dispositivos médicos.

Nesse contexto, esse trabalho tem o objetivo de utilizar metabólitos produzidos por fungos filamentosos, isolados de cascas de árvores, na modulação dos biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii*. A modulação envolve três estratégias: redução da atividade metabólica das células dentro do biofilme (dano ao biofilme), erradicação do biofilme maduro e inibição da formação de biofilme, foco deste estudo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Linhagens:** As linhagens utilizadas foram R265 (*C. gattii* sorotipo C), H99 (*C. neoformans* sorotipo A) e B3501 (*C. neoformans* sorotipo D).

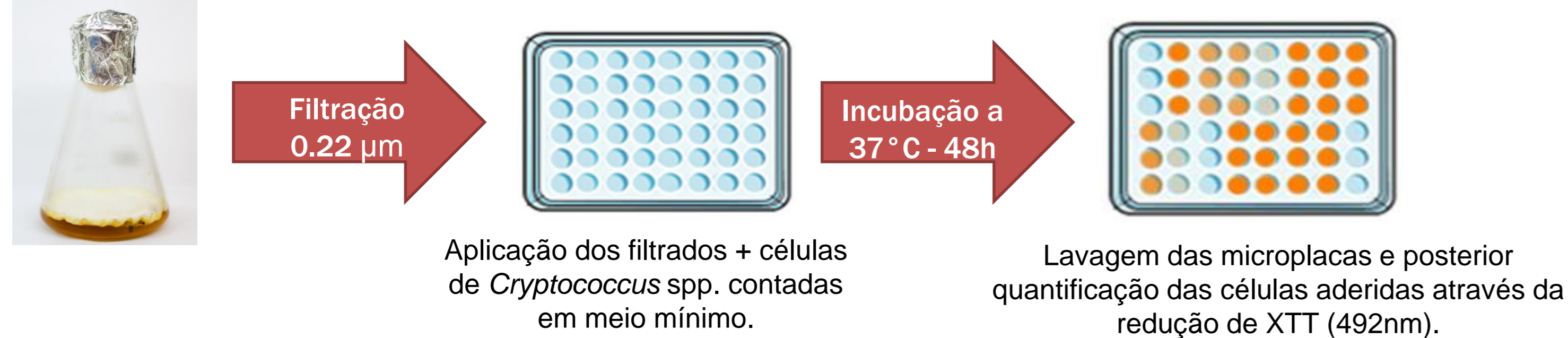
**Fungos filamentosos:** Para buscar metabólitos bioativos, foram isoladas 37 espécies de fungos filamentosos associados a cascas de árvores. Os fungos foram cultivados em dois meios de cultivo líquidos (*Sabouraud* e *Yeast sugar extract*) por 21 dias.



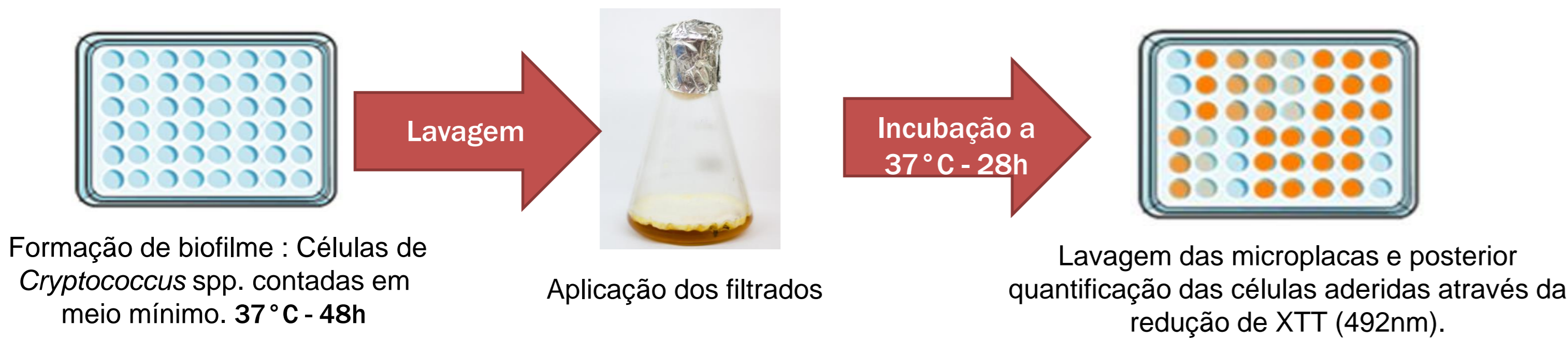
Figura 1: Fungos filamentosos isolados I02, I07, I09, I11, I40.

**Quantificação de biofilme – Redução de XTT em microplaca:** Após as etapas finais de lavagens, adicionou-se 50µL da solução de XTT e 4µL de menadiona 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.

### Ensaio antibiofilme:



### Ensaio de dano ao biofilme:



**Ensaio de erradicação:** Após o tratamento dos biofilmes maduros com os filtrados, as microplacas foram visualizadas com microscópio ótico invertido (400x). Analisou-se a remoção de células aderidas decorrente da atividade de erradicação de biofilme.

**Avaliação da cápsula:** Avaliou-se alterações na cápsula das leveduras decorrentes do tratamento com os filtrados. Células tratadas e controle foram incubadas a 37°C durante 48h em estufa a 10% de CO<sub>2</sub>. A razão do diâmetro total da célula e da célula excluindo a cápsula foi determinada utilizando microscopia óptica.

Imunofluorescência utilizando anticorpo anti-GXM e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para confirmar os achados e correlacionar os dados.

## CONCLUSÕES

Fungos isolados de cascas de árvores possuem alto potencial na produção de compostos bioativos; entre eles compostos antibiofilme e antifúngicos.

A inibição da cápsula de *Cryptococcus* spp., importante fator de virulência, corrobora para a inibição da adesão à superfície. Esse fato indica que o composto ativo apresenta potencial em inibir dois fatores de virulência correlacionados, podendo ser uma alternativa no tratamento de infecções persistentes associadas a biofilme.

## PERSPECTIVAS

- Isolamento do composto ativo (em andamento), avaliação toxicológica, estudo *in vivo*.

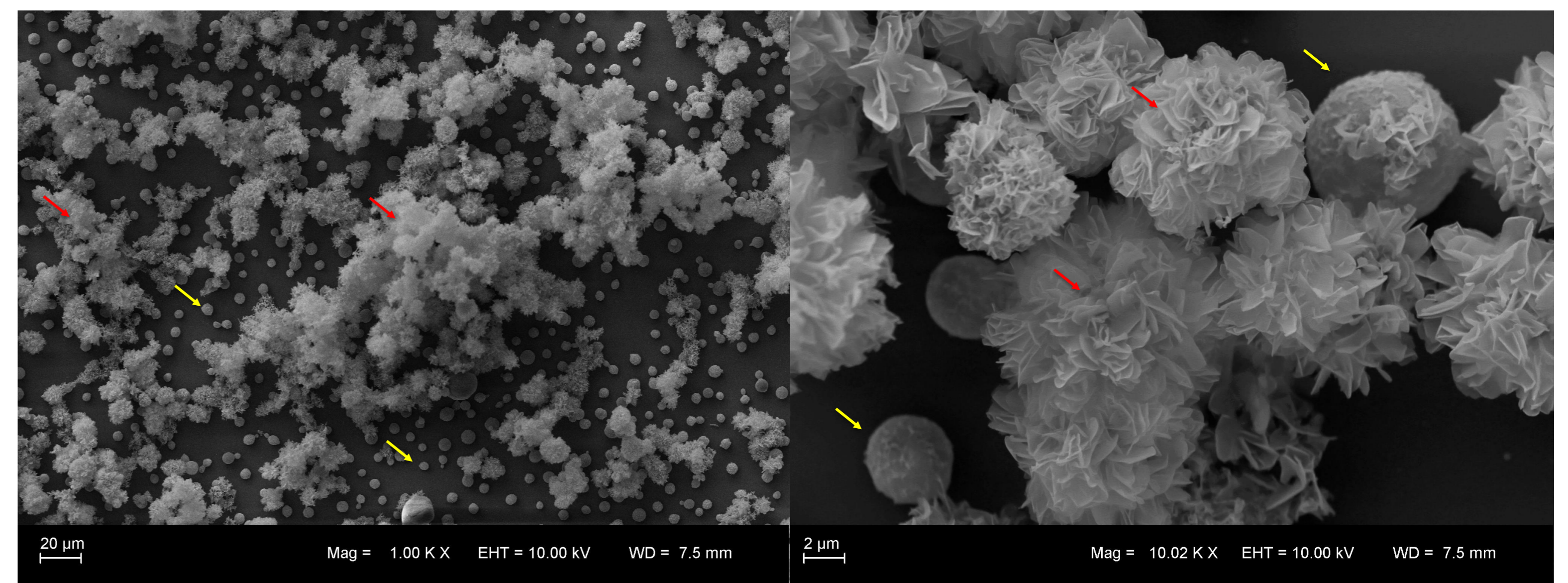


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura de biofilme formado por *Cryptococcus neoformans*. Células (setas em amarelo) matriz (setas em vermelho).  
Imagens: William Lopes

## RESULTADOS

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME**  
Selecionado:  
Filtrado I09SB  
*Fusarium oxysporum*



A atividade de antiformação de biofilme foi encontrada em 11 sobrenadantes de culturas. Para elucidar o mecanismo de inibição de biofilme, foi selecionado o sobrenadante produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum*. A concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC) foi determinada e utilizada para avaliar o efeito deste sobrenadante no tamanho das cápsulas de *C. neoformans* e *C. gattii*.

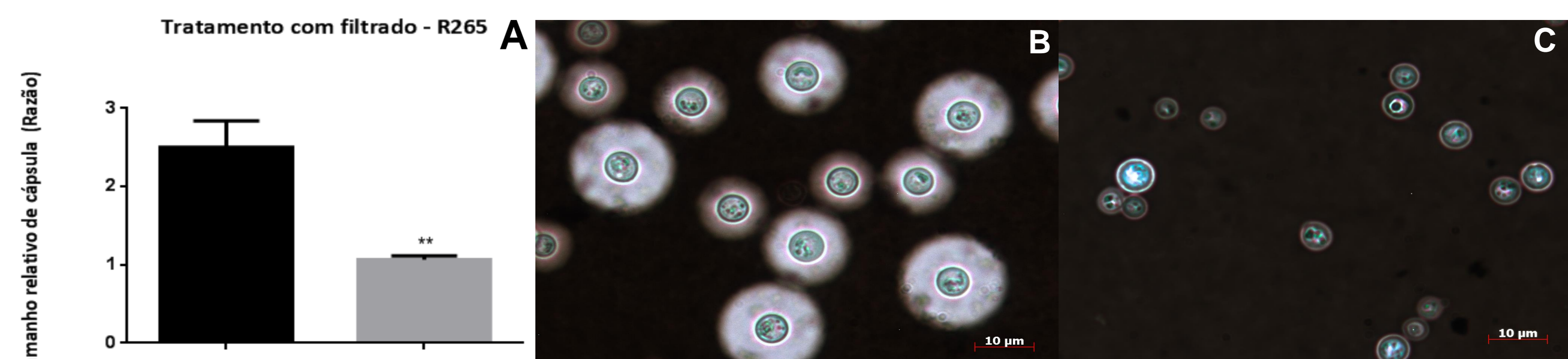


Figura 3: Avaliação do filtrado I09SB em *C. gattii* R265 (A) Tamanho relativo da cápsula após tratamento com filtrado na concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC). (B) Microscopia óptica, controle de indução de cápsula. (C) Inibição da indução de cápsula pelo filtrado.

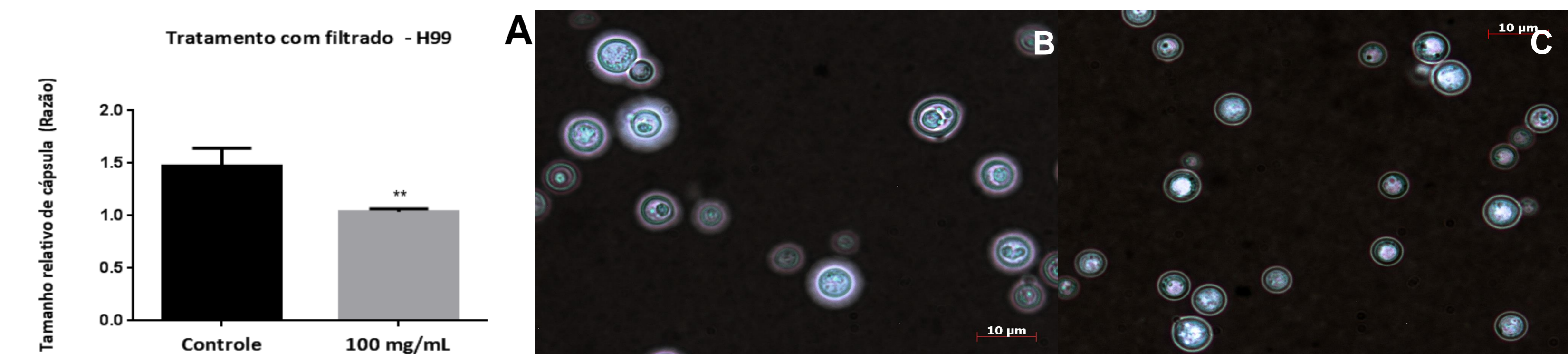


Figura 4: Avaliação do filtrado I09SB em *C. neoformans* H99 (A) Tamanho relativo da cápsula após tratamento com filtrado na concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC). (B) Microscopia óptica, controle de indução de cápsula. (C) Inibição da indução de cápsula pelo filtrado.

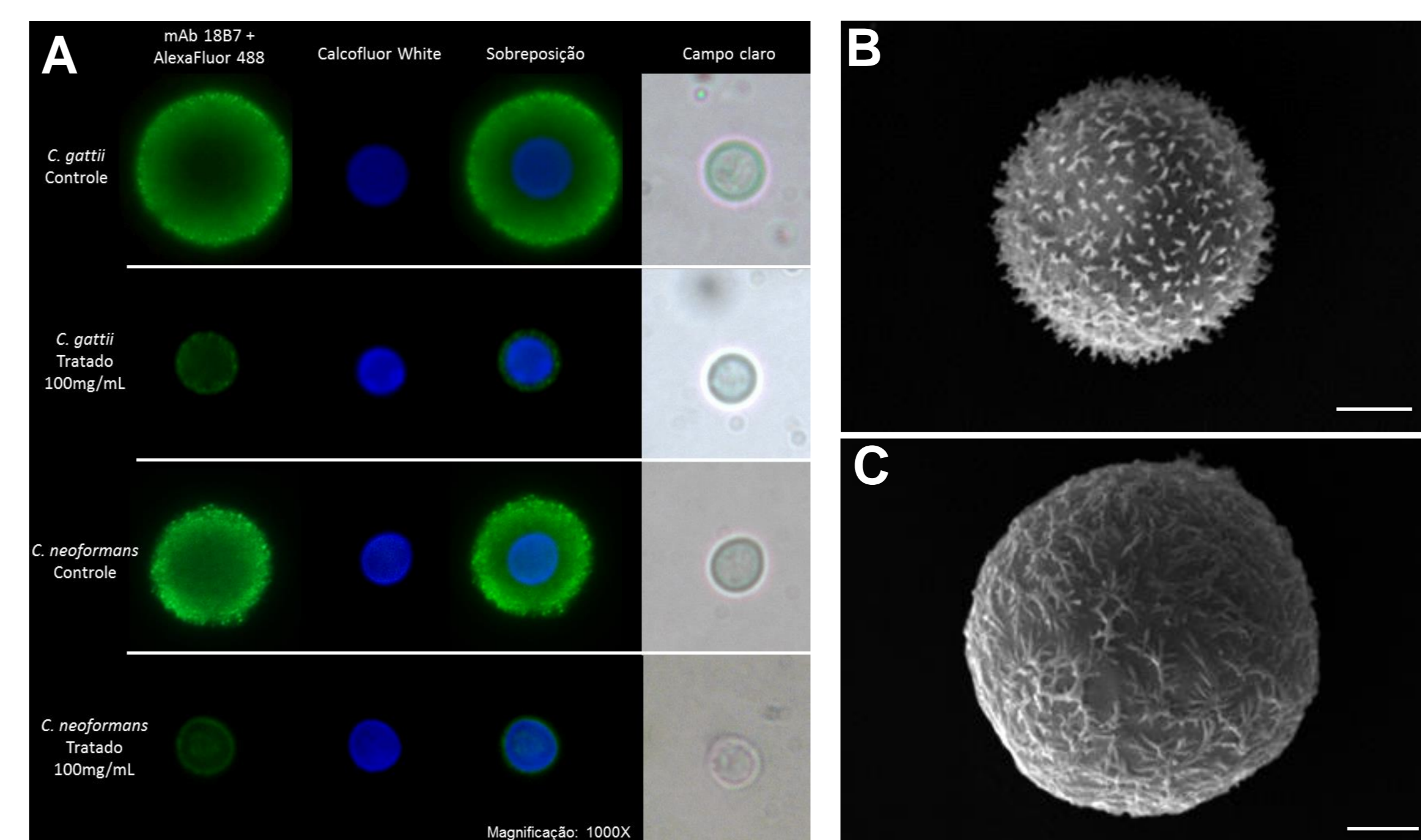


Figura 5: Análise de inibição da cápsula. (A) Imunofluorescência utilizando anticorpo anti-GXM 18B7. Células controle e tratadas. (B) Microscopia eletrônica de varredura. (C) Célula de *C. neoformans* tratada com filtrado. As barras representam o tamanho relativo a 1µm.

## FRACIONAMENTO BIOGUIADO – ATIVIDADE ANTIBIOFILME

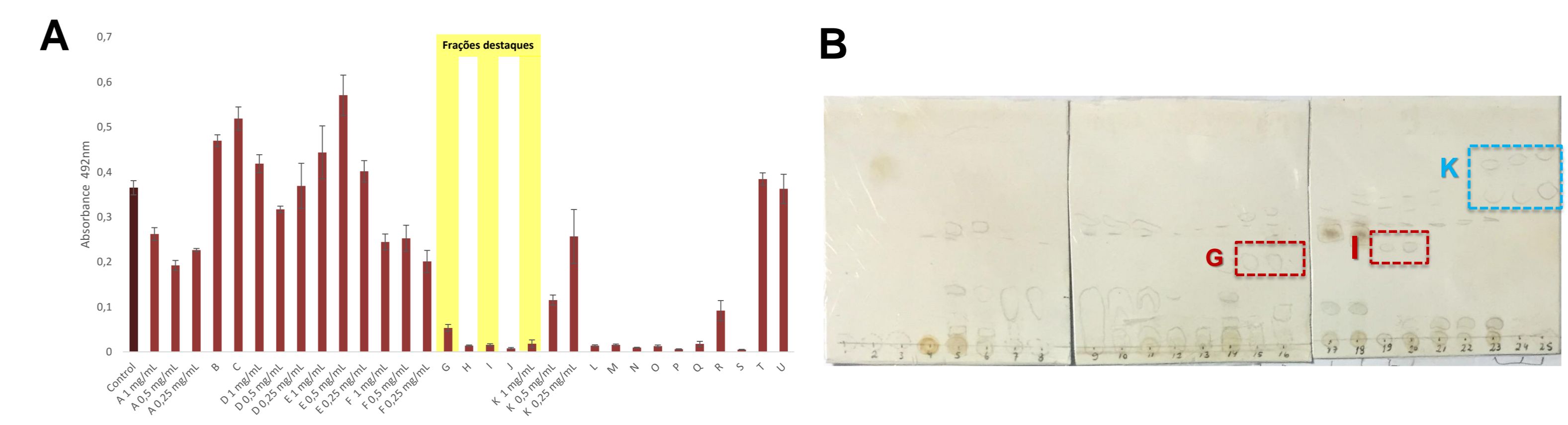


Figura 6: Fracionamento bioguiado (A) Ensaio antibiofilme das frações obtidas em coluna Sephadex; frações G e I (antibiofilme), K antifúngica. (B) Perfil das frações em CCD.

## 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*