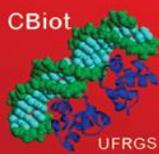


PROTEÍNA PRODUZIDA POR FUNGO FILAMENTOSO ERRADICA BIOFILME FORMADO POR *Cryptococcus neoformans*



Manoela Mace^{1,2}, Marilene Henning Vainstein²
¹Aluna de graduação em Farmácia; ²Centro de Biotecnologia, UFRGS

INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans, levedura encapsulada, é um dos agentes causadores da criptococose, infecção que acomete o sistema nervoso central e ocasiona meningite. Anualmente, se estabelecem cerca de 220.000 novos casos de criptococose. *C. neoformans* é um patógeno formador de biofilme, estrutura que se encontra associada a dispositivos médicos e ao tecido nervoso na forma de criptococoma. Biofilmes são comunidades de micro-organismos que se encontram aderidas a superfícies bióticas e abióticas e revestidas por uma matriz extracelular, promovendo aumento da resistência frente à terapia antimicrobiana e ao sistema de defesa do hospedeiro. Neste contexto, esse trabalho tem o objetivo de utilizar metabólitos produzidos por fungos filamentosos, isolados de cascas de árvores, na atividade de erradicação (remoção) de biofilme de *Cryptococcus neoformans*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem: B3501 (*Cryptococcus neoformans* sorotipo D).

Fungos filamentosos: 37 espécies de fungos filamentosos foram previamente isoladas de cascas de árvores.

Produção de metabólitos: Os fungos isolados foram cultivados em caldos YES (150 g/L de sacarose e 20 g/L de extrato de levedura) e Sabouraud (20 g/L de glicose e 10 g/L peptona de caseína) por 21 dias a 28°C para produção de metabólitos bioativos. Testou-se os metabólitos com *C. neoformans* B3501 para rastreamento da atividade de antifomação, dano e erradicação de biofilme.

Quantificação de biofilme – Redução de XTT em microplaca: Para quantificação do ensaio, adicionou-se 50 µL da solução de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) e 4 µL de menadiona (cofator) em cada poço. As microplacas foram incubadas a 37°C por 5h. A mudança de cor decorrente da redução mitocondrial do XTT com formação do formazan foi medida utilizando leitor de microplacas (SpectraMax i3x) em 492 nm.

Ensaio de erradicação de biofilme: A partir dos dados de rastreamento, selecionou-se um dos fungos filamentosos para realização do ensaio de erradicação de biofilme formado por *Cryptococcus neoformans*.



Figura 1 – Esquema ilustrando o ensaio de erradicação, com cultivo dos fungos isolados, inóculos de *C. neoformans* em microplacas de 96 poços, tratamento com os filtrados, lavagem e quantificação por XTT.

Isolamento do composto ativo de forma bioguiada:

Precipitação das proteínas através de precipitação isoelétrica utilizando metanol seguida de centrifugação (4000 rpm/ 10 min /4°C). A separação dos metabólitos produzidos pelo fungo selecionado foi feita em coluna gravimétrica Sephadex G-200.

EM ANDAMENTO:

- Identificação molecular do fungo de interesse;
- Elucidação da estrutura do metabólito ativo (espectroscopia de massas);
- Microscopia eletrônica de varredura do biofilme tratado com a fração bioativa.

CONCLUSÃO:

O rastreamento de atividade de antifomação, dano e erradicação de biofilme de *Cryptococcus neoformans* B3501 evidenciou o potencial de fungos filamentosos na produção de compostos bioativos. O metabólito produzido pelo fungo selecionado (I13) foi testado novamente, precipitado e está em análise de identificação estrutural do composto, que apresenta atividade antivirulência. Dessa forma, a molécula a ser elucidada segue uma alternativa eficaz para infecções persistentes.

APOIO FINANCEIRO: CNPq e FAPERGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Martínez, L. R., and A. Casadevall. 2015. **Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans***. *Microbiology Spectrum*; Rajasingham, R., et al. 2017. **Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis**. *The Lancet Infectious diseases*.

RESULTADOS

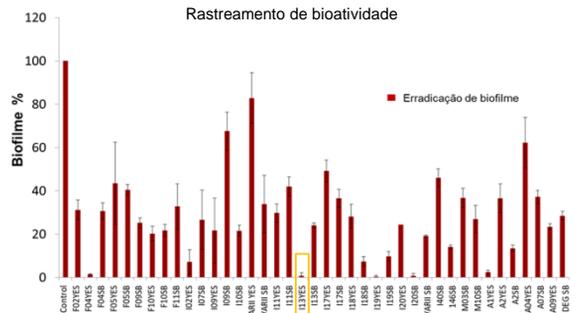


Figura 2 - Rastreamento da atividade de erradicação, dano e antifomação de biofilme formado por *C. neoformans* B3501 após tratamento das células com os metabólitos bioativos produzidos pelos fungos filamentosos. Destacado em amarelo, o fungo selecionado (I13YES).

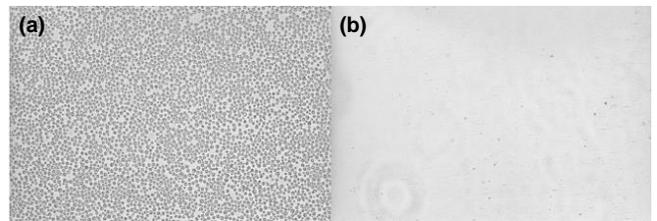


Figura 3 - (a) Controle *C. neoformans* B3501. (b) Células tratadas com o filtrado produzido pelo fungo filamentoso selecionado (I13YES) com atividade de erradicação de biofilme. (460X)

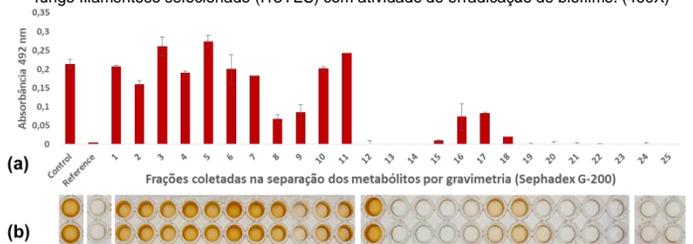


Figura 4 – (a) Ensaio de erradicação empregando as frações coletadas na separação por gravimetria dos metabólitos bioativos do fungo selecionado (I13YES). (b) Quantificação do ensaio de erradicação de biofilme por XTT (leitura em 492 nm).

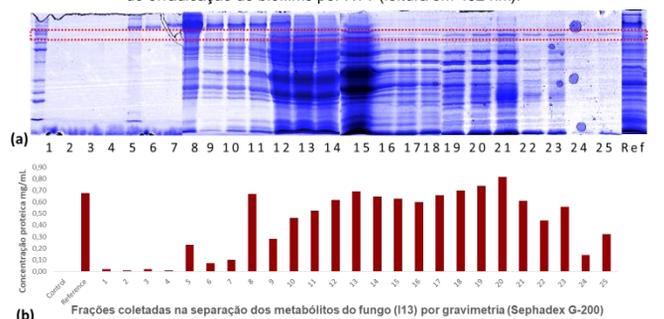


Figura 5 – (a) Eletroforese em gel de poliácridamida com as frações coletadas na coluna gravimétrica para separação dos metabólitos bioativos do fungo selecionado. Pontilhado em vermelho, a possível banda com o metabólito bioativo. (b) Concentração proteica das frações coletadas por gravimetria quantificadas por NanoDrop.