



CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL COMO METODOLOGIA PARA ISOLAMENTO DE VESÍCULA EXTRACELULAR DE *Fusarium oxysporum*

Deisiany G. Ferreira^{1*}, Bruna Sabatke², Izadora Rossi², Jhon Artunduaga³, Leandro Honorato³, Abel Sana², Letícia Bonato², Leonardo Nimrichter³, Marcel Ivan Ramirez² Melyssa Fernanda Norman Negri¹

¹Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, Brasil

²Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

³Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*deisygomes30@gmail.com

Área Temática: Doenças infecciosas e parasitárias

Resumo

Fusarium oxysporum é um fungo conhecido por sua capacidade fitopatogênica e sua crescente ameaça frente à indivíduos imunossuprimidos devido seus amplos fatores de virulência. As vesículas extracelulares (VEs) são responsáveis por carrear fatores de comunicação e virulência, portanto o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a metodologia de centrifugação diferencial para isolamento de VEs de *F. oxysporum*. Foi realizado um inóculo de $1,2 \times 10^7$ conídios/mL e incubado durante 7 dias. A cada 24 horas foi retirado uma alíquota e realizado uma sequência de centrifugações. Para a análise de concentração e tamanho das VEs, foi realizada a análise por Nano Tracking Analysis e microscopia eletrônica de transmissão. A metodologia se mostrou eficaz para isolar populações de VEs de diferentes tamanhos e em altas concentrações. Ressaltamos que houve um aumento da concentração de VEs ao longo da cinética de crescimento deste isolado, indicando uma possível relação com o aumento de células fúngicas no meio.

Palavras-chave: Vesícula extracelular; *Fusarium oxysporum*; centrifugação diferencial.

Introdução

O complexo *Fusarium oxysporum* (FOSC) é compreendido por fungos filamentosos onipresentes, conhecido por sua capacidade patogênica em diversas espécies vegetais, responsável por importantes prejuízos na produção agrícola (Silva *et al.* 2021). Além do impacto na agricultura, estudos evidenciam que a espécie *F. oxysporum* também pode representar uma ameaça à saúde humana, com um amplo espectro de infecção, desde micoses superficiais, como onicomicose, até micoses sistêmicas que podem levar o indivíduo à óbito (Silva *et al.* 2021). As VEs são partículas de dupla camada lipídica, heterogêneas em tamanho, conteúdo e função (Rizzo *et al.* 2020). Nos últimos anos, têm emergido como importantes mediadoras de comunicação intercelular em uma variedade de organismos, incluindo protozoários, bactérias, vírus, e fungos (Rizzo *et al.* 2020; Sabatke *et al.* 2021). Diferentes metodologias são utilizadas para o isolamento de VEs, envolvendo técnicas de purificação e concentração de amostra, como cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) e ultracentrifugação. Até o momento, as metodologias presentes na literatura apresentam vantagens e desvantagens, por isso a necessidade de novas técnicas para isolamento de VEs provenientes de fungos (Rizzo *et al.* 2020). As VEs secretadas por patógenos fúngicos desempenham um papel crucial



na modulação da resposta imunológica do hospedeiro e na promoção da virulência (Rizzo *et al.* 2020; Peres da Silva *et al.* 2018). Para a avaliação do papel das VEs é necessário uma técnica de isolamento bem definida, simples e econômica. Portanto, o presente isolou VEs provenientes de *F. oxysporum* ao longo de sua cinética de crescimento por uma metodologia alternativa de centrifugação diferencial.

Materiais e métodos

*Cultura em meio líquido de *F. oxysporum**

Este estudo foi conduzido com isolado clínico depositado nas Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense (CMRP 2925). Foi realizado inóculo de $1,2 \times 10^7$ conídios/ml em meio Sabouraud Dextrose Broth (SDB; DifcoTM, Detroit, MI, USA) sob agitação constante de 200 RPM à 30 °C.

Isolamento de VEs por centrifugação diferencial

A metodologia de centrifugação diferencial foi realizada de acordo com Sana A. *et al.* (2023). Consistindo em uma série de centrifugações, sendo estas, 425xg por 5 min, seguido por 4000xg por 30 min e posteriormente, 15000xg por 1 hora. As VEs foram quantificadas utilizando o Nanoparticle Tracking Analysis (NTA-LM10 Nanosight, Malvern, UK) e a morfologia foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando a técnica de contrastação negativa de acordo com Rodrigues *et al.* (2007).

Resultados e discussão

A partir da centrifugação diferencial, fomos capazes de isolar populações de VEs de diferentes tamanhos, que variaram de 25 nm a 600 nm e em altas concentrações ($1,17 \times 10^9$ /mL a $4,48 \times 10^9$ /mL). Quando comparada a outras técnicas de isolamento de VEs provenientes de fungos, a metodologia aqui proposta se mostrou mais simples e econômica, sem a necessidade de equipamentos de concentração de amostras, ou ultracentrífugas (Rizzo *et al.* 2020). *F. oxysporum* durante sua cinética de crescimento de 7 dias, evidenciou um aumento significativo da concentração de VEs à partir de 120h. Nas primeiras 96 horas de crescimento fúngico, as concentrações e a média de tamanhos das VEs não apresentaram variação significativa entre si. A partir de 120 horas de crescimento, houve um aumento na concentração ($2,18 \times 10^9$ /mL) e um pico na média de tamanho das partículas 455 nm. Já em 144h, houve um grande aumento quando comparado à 120h, apresentando uma concentração de $3,96 \times 10^9$ /mL, com VEs de tamanho menor, com uma média de 220 nm. Em 168h, último tempo de análise das VEs, observamos uma maior concentração ($4,48 \times 10^9$ /mL), com a média de tamanho próximo aos dos 4 primeiros tempos de crescimento (148 nm) (Figura 1).

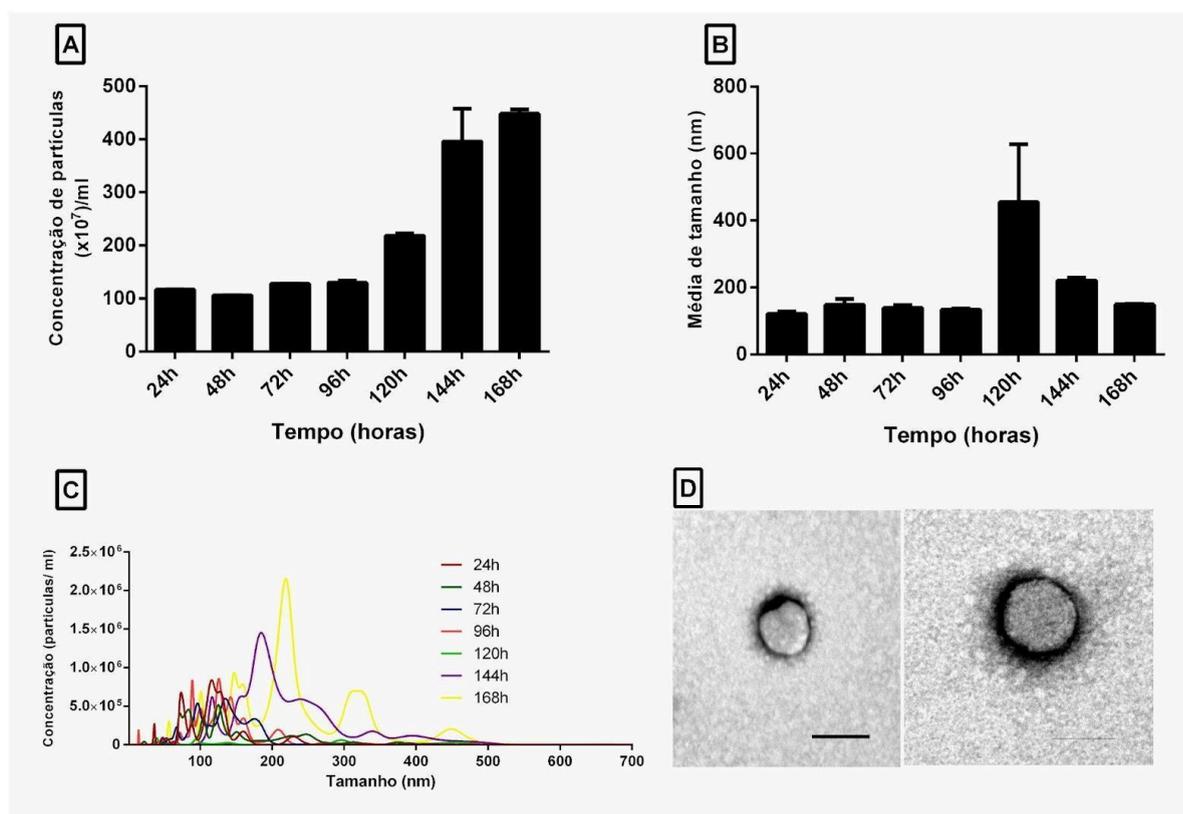


Figura 1– Liberação de vesículas ao longo da cinética de crescimento de *F. oxysporum*. A) Concentração de partículas por mL a cada 24h de crescimento fúngico. B) Média de tamanho de partículas a cada 24h de crescimento fúngico. C) Distribuição de concentração de partículas por tamanho em nm de cada tempo avaliado. D) Estrutura de VEs de *F. oxysporum* por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao compararmos a concentração e tamanho de VEs isoladas de *F. oxysporum* com Bleackley, et al. (2023), foi possível observar uma média de tamanho de VEs semelhante (155 nm). Entretanto, a concentração de VEs foi maior pela metodologia tradicional (1×10^{12} partículas/mL), atribuímos esse fator à utilização de ultracentrifuga que consegue isolar maior quantidade de vesículas menores (SEVs). Apesar de uma concentração menor de VEs a centrifugação diferencial segue sendo uma alternativa para isolamento de partículas maiores (LEVs).

Conclusões

O presente estudo foi o primeiro a isolar VEs de *F. oxysporum* por centrifugação diferencial, uma técnica simples e econômica de ser realizada quando comparada a outras metodologias de isolamento de VEs provenientes de fungos. Chamamos atenção para o aumento da concentração de VEs ao longo da cinética de crescimento deste isolado, indicando uma relação com o aumento de células fúngicas no meio. Ressaltamos que o conteúdo dessas vesículas seguem desconhecidos, necessitando de mais estudos que elucidem o papel das VEs na relação patógeno-hospedeiro.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Código de Financiamento 001.



Referências

BLEACKLEY, Mark R., *et al.* "Extracellular vesicles from the cotton pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* induce a phytotoxic response in plants." **Frontiers in plant science** 10 (2020): 488444.

PERES, R. *et al.* Extracellular Vesicles From *Aspergillus flavus* Induce M1 Polarization in Murine Macrophages. **Front. Immunol.** 9, 276 (2018). DOI: 10.3389/fimmu.2018.00276

RODRIGUES, M.L. *et al.* Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. **Eukaryot. Cell** 7, 58–67 (2008). DOI: 10.1128/EC.00370-07

RIZZO, J. *et al.* The Potential Role of Extracellular Vesicles in the Pathogenesis of Fungal Infections and their Application in Vaccine Development. **Vaccines** 8, 578 (2020). DOI: 10.3390/vaccines8040578

SABATKE, B. *et al.* "Unveiling the role of EVs in anaerobic parasitic protozoa." **Molecular Immunology** 133 (2021): 34-43.

SANA, A., *et al.* An Improved Method to Enrich Large Extracellular Vesicles Derived from *Giardia intestinalis* through Differential Centrifugation. **Life**, v. 13, n. 9, p. 1799, 2023.

SILVA, L.P., de Andrade, R.V., Grossi-de-Sa, M.F. *et al.* *Fusarium oxysporum* Genomics: Past, Present and Future Perspectives Towards Its Control. **Genes** 12, 471 (2021). DOI: 10.3390/genes12040471