



POTENCIAL AÇÃO DE UM MOLÉCULA DE QUORUM SENSING DE *Fusarium oxysporum* EM *Candida tropicalis*

Emilli Karine Marcomini^{1*}, Melyssa Negri¹

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

*emillimarcomini@gmail.com

Área Temática: Doenças infecciosas e parasitárias.

Resumo

Moléculas de *quorum sensing* (MQS) têm se destacado no segmento antifúngico, sendo empregadas para inibir o crescimento de diferentes espécies fúngicas, a exemplo de 2-etil-1-hexanol (2-EH), que foi detectado recentemente como MQS de *Fusarium oxysporum*, sendo capaz de inibir completamente o crescimento e modular o biofilme desta espécie. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo identificar *in silico* potenciais alvos de ligação da molécula e avaliar *in vitro* a susceptibilidade de *Candida tropicalis* frente a molécula 2-EH. Quatro potenciais alvos de ligação da MQS foram identificados *in silico* e estão presente em *C. tropicalis*, estando associados a transcrição, transporte e metabolismo. Pela primeira vez a susceptibilidade de 2-EH foi avaliada frente a *C. tropicalis* e os resultados *in vitro* indicam que a MQS apresenta potencial antifúngico e tem efeito fungicida, inibindo o crescimento e a viabilidade celular na concentração de 0,0260 g/mL. No entanto, futuras pesquisas precisam ser realizadas para esclarecer o mecanismo de ação, o efeito sobre outros patógenos fúngicos bem como avaliar a ação em biofilmes fúngicos.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*; Comunicação Celular; Fungos.

Introdução

Moléculas de *quorum sensing* (MQS), a exemplo de farnesol, tirosol, 2-feniletanol e triptofano, tem sido consideradas como potenciais agentes antifúngicos, inibindo o crescimento celular e modulando processos cruciais do desenvolvimento fúngico, não apenas nas espécies em que foram detectadas, mas também em outras espécies fúngicas (Tian *et al.*, 2021; Marcomini e Negri, 2023). Recentemente, 2-etil-1-hexanol (2-EH) foi detectado como uma MQS de *Fusarium oxysporum*, sendo capaz de modular o biofilme desta espécie e matar *F. oxysporum* em determinadas concentrações (Veiga *et al.*, 2023). Ao nosso conhecimento, não há estudos analisando o efeito de 2-EH em espécies fúngicas de interesse nosocomial. Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar *in silico* potenciais alvos de ligação e avaliar *in vitro* a susceptibilidade de *Candida tropicalis* frente a molécula 2-EH.

Materiais e métodos

Os alvos de ligação de 2-EH foram previstos *in silico* utilizando o *software Super-Pred*. Depois da listagem geral de alvos no qual a molécula potencialmente atuava, estes alvos foram consultados individualmente na *National Library of Medicine* (NLM) e no banco *UniProt* para averiguar a função, localização e se estavam presentes em *C. tropicalis*. Posteriormente, 2-EH (CAS: 104-76-7) foi adquirido comercialmente da *Sigma Aldrich* (538051-MKCG7158), com densidade de 0,833 g/mL e testado *in vitro*. A preparação foi realizada diluindo a molécula pura



em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) na proporção de 1:2, com concentrações variando de 0,4165 a 0,0008 g/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) de 2-EH frente *C. tropicalis* (ATCC 750) foi determinada de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M27-A2 e a concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada pela semeadura em placas de ágar Sabouraud dextrose (SDA), bem como, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), obtendo a quantificação de UFC/mL.

Resultados e discussão

A predição de alvos *in silico* permitiu a identificação de 129 ligantes e proteínas, com probabilidade de ligação superior a 50%, que estão envolvidos com a atividade biológica de 2-EH, em diferentes organismos, dos quais apenas quatro alvos estavam presentes em *C. tropicalis*, estando associada a transcrição, transporte e metabolismo (Tabela 1).

Tabela 1 - Previsão *in silico* de ligação da molécula 2-etil-1-hexanol, probabilidade de ligação expressa em percentual, função biológica, localização subcelular de cada alvo presente em *Candida tropicalis*

Alvo	Probabilidade (%)	Função	Localização
Diidrofolato redutase	69,82	Metabolismo de ácido fólico	Citosol e mitocôndria
DNA topoisomerase I	63,82	Alongamento das fitas de DNA e regulação da transcrição de RNA polimerase II	Citosol e núcleo
Acyl-CoA desaturase	62,4	Transporte de elétrons, ligação de íons ferro e metabolismo lipídico	Membrana
Adenosilhomocisteína	60,44	Biossíntese de aminoácidos	Citoplasma

O potencial alvo diidrofolato redutase (69,82%) é uma enzima presente na maior parte dos organismos, estudada para tratamento de infecções devido às substanciais diferenças com humanos, sendo avaliada como potencial alvo de fármacos para espécies de *Candida* (DeJarnette *et al.*, 2020). DNA topoisomerase 1 (63,82%) e adenosilhomocisteína (60,44%), localizados no citosol, nucléolo e citoplasma vêm sendo estudadas por afetar o crescimento, morfologia e controle da homeostase celular fúngica, sendo potencial alvo para o desenvolvimento racional de antifúngicos, especialmente em *Candida* spp. (Tagle-Olmedo *et al.*, 2021; Vizán *et al.* 2021). Acyl-CoA desaturase (62,4%), um alvo de membrana celular, é capaz de interromper a síntese de esteróis ou formar poros transmembrana, semelhante a ação de azólicos e anfotericina B (Cerone e Smith, 2022). *In vitro* 2-EH apresenta atividade antifúngica frente a células planctônicas de *C. tropicalis*, com CIM e CFM de 0,0260 g/mL. Na contagem de UFC, observa-se que a molécula apresenta atividade fungicida, reduz viabilidade celular e diminui significativamente o número de células em comparação ao controle não tratado (Figura 1).

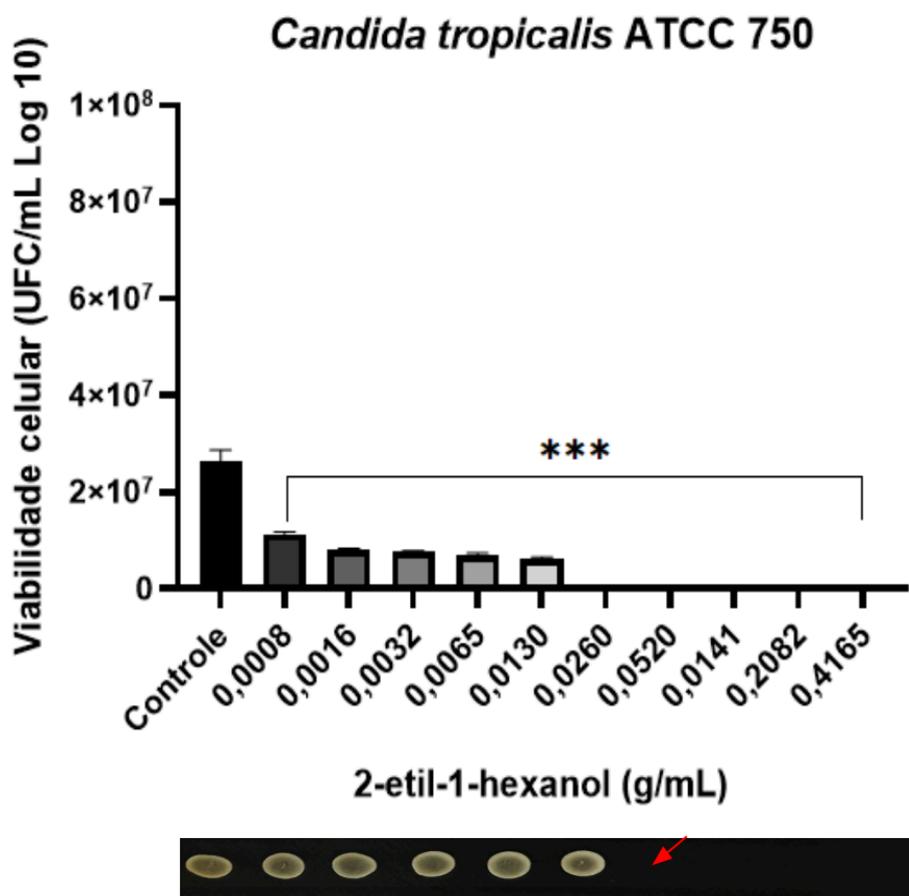


Figura 1 – Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e concentração fungicida mínima (CFM) da molécula 2-etil-1-hexanol em células planctônicas *Candida tropicalis* ATCC 750, indicada pela seta vermelha. Todos os testes foram realizados em triplicata e em três dias independentes. As comparações entre tratados e não tratados foram realizadas por meio do teste ANOVA, seguido do teste Tukey, utilizando o software Prism versão 8.0.1, sendo significativo quando $p < 0,0001$ (***)

Infecções fúngicas causadas por espécies *Candida* não-*C. albicans* têm se tornado uma ameaça constante e ganharam grande importância nos últimos anos, a exemplo de *C. tropicalis*, que foi considerada pela Organização Mundial de Saúde como um patógeno fúngico de alta prioridade (WHO, 2022). As principais preocupações incluem a capacidade desse patógeno de evadir os mecanismos de ação de diferentes fármacos, o que impulsiona a busca por moléculas capazes de inibir o crescimento fúngico (Friedman e Schwartz, 2019).

Conclusões

In silico foi identificado que 2-EH apresenta ligação a quatro potenciais alvos presentes na membrana, mitocôndria, citoplasma, citosol e no núcleo de *C. tropicalis*, envolvidos em função metabólicas, de transcrição e transporte. *In vitro*, esta MQS apresenta efeito fungicida frente a células planctônicas de *C. tropicalis* e tem capacidade de reduzir a viabilidade celular e o número de células, contudo, futuras pesquisas são necessárias para determinar potencial antifúngico desta molécula frente a outros patógenos fúngicos, em biofilmes e esclarecer o mecanismo de ação.



Agradecimentos

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

Referências

CERONE, M; SMITH, TK. Desaturases: Structural and mechanistic insights into the biosynthesis of unsaturated fatty acids. *IUBMB Life*, v.74, p.1036-1051, 2022.

DEJARNETTE, C. *et al.* Dihydrofolate reductase is a valid target for antifungal development in the human pathogen *Candida albicans*. **mSphere**, v.5, e00374-20, 2020.

FRIEDMAN, D.Z.P. ; SCHWARTZ, I.S. Emerging fungal infections: New patients, new patterns, and new pathogens. **J. Fungi**, v. 5, p. 67, 2019.

MARCOMINI, E. K.; NEGRI, M. Fungal quorum-sensing molecules and antiseptics: A promising strategy for biofilm modulation? **Drug discovery today**, v.28, 103624, 2023.

TAGLE-OLMEDO, T. *et al.* Inhibitors of DNA topoisomerases I and II applied to *Candida dubliniensis* reduce growth, viability, the generation of petite mutants and toxicity, while acting synergistically with fluconazole. **FEMS Yeast Res.**, v.21, n.3, foab023, 2021.

TIAN, X. *et al.* Sensing in fungal species. **Annu Rev Microbiol**, v.75, p.449–469, 2021.

VEIGA, F.F. *et al.* Detection of 2-ethyl-1-hexanol and its modulating effect in biofilm of *Fusarium oxysporum*. **Mol Microbiol**, 2023.

VISRAM, M. *et al.* **Homocysteine regulates fatty acid and lipid metabolism in yeast.** *J Biol Chem.*, v.293, p.5544-5555, 2018.

WHO. Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action Geneva: **World Health Organization**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241> Acesso em: 19/07/2024.