



Anais Brasileiros de Dermatologia

www.anaisdedermatologia.org.br



CARTAS - INVESTIGAÇÃO

Caracterização *in vitro* de biofilme produzido por *Fusarium oxysporum*, um agente de onicomicose ☆☆☆

Prezado Editor,

Onicomicose causada por fungos não dermatófitos, como *Fusarium* spp., é mais prevalente do que se pensava anteriormente, especialmente em climas mais quentes.¹ Além disso, a onicomicose tem sido atualmente atribuída a fungos que se organizam em forma de biofilme.² O biofilme é uma comunidade microbiana complexa, altamente aderida à unha e cercada por matriz que fornece proteção e resistência antifúngica.^{2,3}

O grupo de pesquisa dos autores tem estudado o gênero *Fusarium* spp. como agente de onicomicose em hospedeiros imunocompetentes. Foi relatada sua alta prevalência na região estudada, e foram estabelecidos critérios clínicos e laboratoriais para esse gênero como agente causal de onicomicose, determinando o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos sistêmicos mais comumente usados no Brasil.⁴ Posteriormente, os autores provaram que *Fusarium* spp. usa a queratina ungueal como fonte única de nutrientes,⁵ e foram iniciados estudos sobre a etiopatogenia da onicomicose causada por *Fusarium* com base em modelo *ex vivo* usando fragmentos de unha humana estéril.³

Mais recentemente, foi relatado pelos autores, pela primeira vez, que *Fusarium oxysporum* é capaz de formar biofilme na unha humana como única fonte nutricional.^{6,7} Também foi descrita molécula orgânica volátil 2-etil-1-hexanol (2EH) como componente de *quorum sensing* capaz de modular tal biofilme.⁸ Essas descobertas foram relevantes para confirmar a etiopatogenia da onicomicose por *Fusarium*. Entretanto, não revelaram as características próprias do biofilme formado sob suporte nutricional. Assim, o

presente estudo teve como objetivo caracterizar a formação de biofilme *in vitro* de *F. oxysporum*, avaliando sua capacidade natural, durante sete dias, com disponibilidade controlada de nutrientes.

Este estudo foi conduzido com *F. oxysporum* CMRP2925 isolado de um caso de onicomicose descrito anteriormente.⁴ O isolado foi reativado para confirmar sua pureza e identificação, antes dos ensaios, e foi cultivado em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Difco™, MI, EUA) por sete dias a 25°C. Os biofilmes foram preparados de acordo com Galletti et al.,⁹ com algumas modificações. Suspensão contendo 1×10^7 conídios mL⁻¹ foi preparada em meio RPMI 1640 (Gibco, NY, EUA), com L-glutamina, bicarbonato de sódio, ácido 3-(N-morfolino)propanossulfônico 0,165 M (pH 7,2) e glicose a 2%. Essa suspensão foi colocada em placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços e incubada a 35°C em agitador a 110 rev min⁻¹, por sete dias. A cada 24 horas, o meio de cultura era renovado removendo 100 µL do líquido antigo e adicionando o mesmo volume de RPMI fresco. Durante os sete dias, os biofilmes foram avaliados sob diferentes aspectos, como descrito anteriormente.^{6,9} Resumidamente, a viabilidade celular foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), quantificação da biomassa total por violeta cristal, atividade metabólica pelo ensaio de redução do sal de tetrazólio, 2,3-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-([fenilamino]carbonil)-2H hidróxido de tetrazólio (XTT), caracterização da matriz extracelular (MEC) e observação da estrutura do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

No geral, as características do biofilme foram semelhantes, traçando paralelo entre maior suporte nutricional com RPMI e apenas tecido ungueal.⁶ Em ambas as situações, foi possível mostrar que o terceiro e quarto dias foram críticos. Em meio rico e pH neutro, o número de UFC permaneceu constante em todos os momentos (fig. 1A), desde o primeiro dia, com aumento da atividade metabólica no terceiro dia, estabilizando-se a partir desse momento. Perfil semelhante foi encontrado para proteínas e ácidos nucleicos. Curiosamente, os polissacarídeos foram significativamente consumidos até o terceiro dia, continuando a declinar gradualmente até o sétimo dia. Por outro lado, utilizando tecido ungueal como fonte nutricional, observou-se aumento de UFC até o terceiro dia, alta atividade metabólica apenas no quarto dia, enquanto o aumento de proteínas e carboidratos ocorreu tardiamente, corroborando os resultados dos ácidos nucleicos.⁶ Essas diferenças podem ser atribuídas à disponibilidade de nutrientes, com renovação diária do meio RPMI

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2024.11.005>

☆ Como citar este artigo: Barros ILE, Veiga FF, Estivalet Svidzinski TI. *In vitro* characterization of biofilm produced by *Fusarium oxysporum*, an onychomycosis agent. An Bras Dermatol. 2025;100. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2024.11.005>.

☆☆ Trabalho realizado na Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

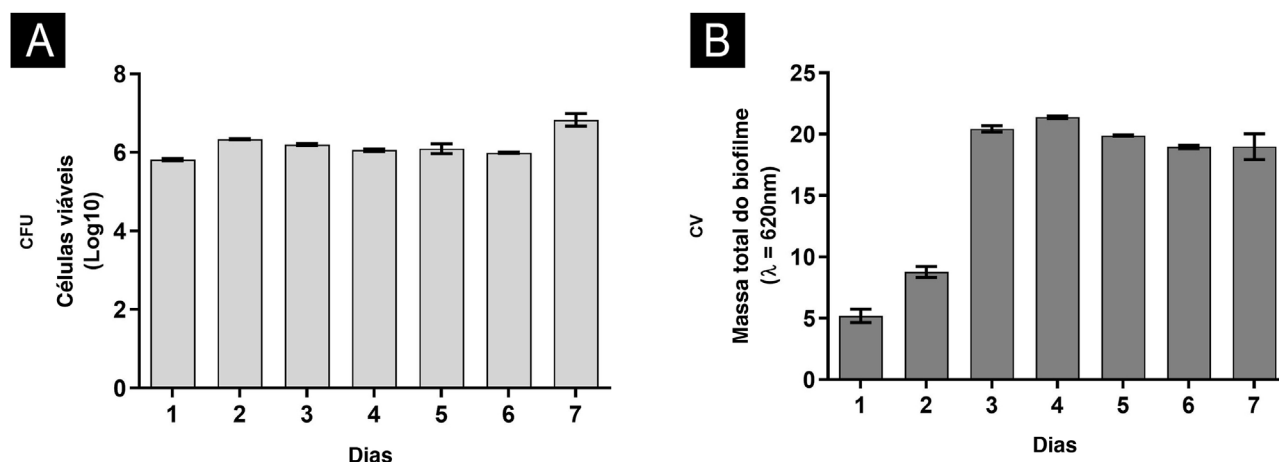


Figura 1 Caracterização do biofilme produzido por *Fusarium oxysporum* em placas de poliestireno de fundo plano de um a sete dias, em meio RPMI. (A) Número de células viáveis pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). (B) Massa total do biofilme pela coloração cristal violeta (CV).

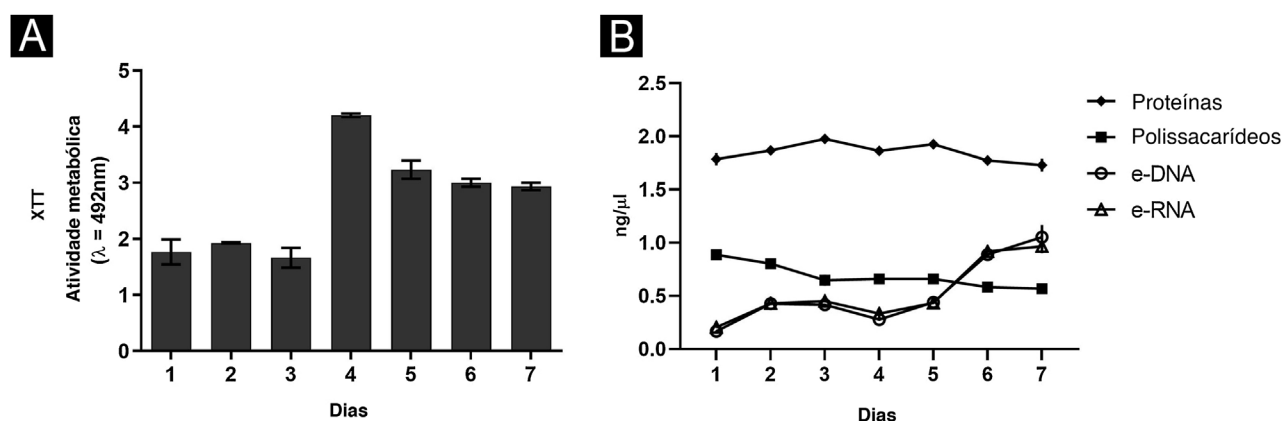


Figura 2 Caracterização do biofilme produzido por *Fusarium oxysporum* em placas de poliestireno de fundo plano de um a sete dias, em meio RPMI. (A) Atividade metabólica por redução de XTT. (B) Quantificação da matriz extracelular (MEC): proteínas, polissacarídeos, DNA e RNA extracelular.

(alimento à vontade), e ao fato de que no tecido ungueal (alimento restrito), o próprio fungo necessitou de período de adaptação.

Além disso, foi observado aumento progressivo na quantidade de biomassa (fig. 1B) entre o primeiro e o terceiro dias, seguido de estabilidade, o que parece estar associado ao consumo de polissacarídeos (fig. 2), componente fundamental durante o desenvolvimento e manutenção do biofilme. Levando-se em consideração que as UFC permaneceram estáveis, esse aumento foi atribuído à grande produção de MEC, em ambiente rico. O aumento da atividade metabólica (fig. 2) reflete-se na síntese de proteínas e ácidos nucleicos, principalmente eRNA. A produção de proteínas parece ser crucial no processo de formação do biofilme e suporte de todo o sistema.^{6,10} Essa ideia é reforçada pelos altos níveis de XTT e eDNA, a partir do quarto dia, uma vez que esse ácido nucleico é necessário em atividades que demandam energia celular, como a construção de um biofilme maduro.¹⁰ A estrutura do biofilme começou pela formação de monocamada celular e, em sete dias, foi observada estrutura tridimensional altamente complexa (figs. 3A e B).

Assim, é lógico supor que a capacidade do *F. oxysporum* de produzir biofilme seja intrínseca. O suporte nutricional parece apenas facilitar as primeiras horas de sua formação, além de favorecer a produção de maior quantidade de componentes bioquímicos associados à maturação e estabilidade do biofilme. Portanto, a presente experiência chama a atenção para as habilidades naturais desse fungo, antes restritas ao interesse ambiental, agrícola e animal. Provavelmente, a seleção natural induzida por pesticidas facilitou sua adaptação aos tecidos humanos. Os autores conseguiram mostrar que seu potencial de virulência (aqui a eficiência na produção de biofilme) é mantido independentemente da adição de suporte nutricional. Esse comportamento, portanto, permite considerar o gênero *Fusarium* spp. patógeno primário de interesse em Dermatologia.

Suporte financeiro

Este trabalho recebeu suporte financeiro parcial da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Código Financeiro 001, por meio de

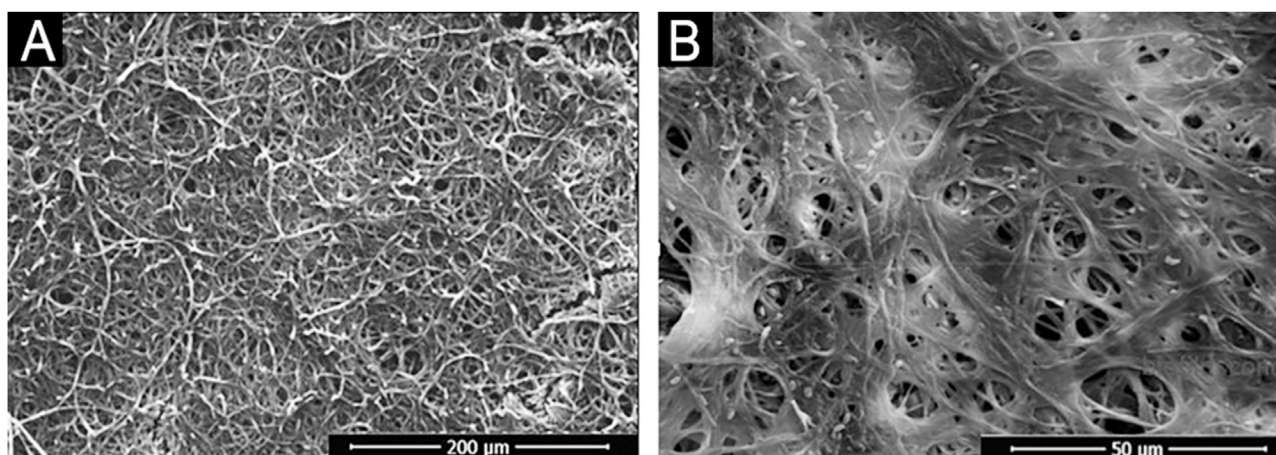


Figura 3 Ilustração de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura do biofilme de *Fusarium oxysporum* de quatro dias. (A) Detalhe da organização estrutural do biofilme, o entrelaçamento e a compactação das hifas (500×). (B) Maior aumento, mostrando a matriz extracelular produzida (2.000×).

bolsa concedida a ILEB); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (Processo número 3128262023-0 concedido a TIES) e INCT-CERBC, 2022, Processo número 406645/2022-1.

Contribuição dos autores

Terezinha Inez Estivalet Svidzinski: Concepção e planejamento do estudo; planejamento e revisão dos experimentos.

Isabella Letícia Esteves Barros: Concepção e planejamento do estudo e planejamento dos experimentos; realização dos experimentos e análise dos dados; elaboração e redação do manuscrito.

Flávia Franco Veiga: Realização dos experimentos e análise dos dados.

Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

- Gupta AK, Stec N, Summerbell RC, Shear NH, Piguet V, Tosti A, et al. Onychomycosis: a review. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2020;34:1972–90.
- Gupta AK, Daigle D, Carviel JL. The role of biofilms in onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74:1241–6.
- Veiga FF, de Castro-Hoshino LV, Sato F, Bombassaro A, Vicente VA, Mendes V, et al. *Fusarium oxysporum* is an onychomycosis etiopathogenic agent. *Future Microbiol*. 2018;13:1745–56.
- Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TI. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *Int J Dermatol*. 2007;46:822–6.
- Galletti J, Negri M, Grassi FL, Kioshima-Cotica ÉS, Svidzinski TI. *Fusarium* spp. is able to grow and invade healthy human nails

as a single source of nutrients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:1767–72.

- Veiga FF, de Castro-Hoshino LV, Sato F, Baesso ML, Silva S, Negri M, et al. Characterization of a biofilm formed by *Fusarium oxysporum* on the human nails. *Int J Dermatol*. 2022;61:191–8.
- Veiga FF, de Castro-Hoshino LV, Rezende PST, Baesso ML, Svidzinski TIE. Insights on the etiopathogenesis of onychomycosis by dermatophyte, yeast and non-dermatophyte mould in ex vivo model. *Exp Dermatol*. 2022;31:1810–4.
- Veiga FF, Marcomini EK, Salvador A, Chiavelli LUR, Barros ILE, de Castro LV, et al. Detection of 2-ethyl-1-hexanol and its modulating effect in biofilm of *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol*. 2024;122:630–42.
- Galletti J, Tobaldini-Valerio FK, Silva S, Kioshima ÉS, Trierveiler-Pereira L, Bruschi M, et al. Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. *Future Microbiol*. 2017;12:1311–21.
- Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol*. 2020;28:668–81.

Isabella Letícia Esteves Barros  a,b,

Flávia Franco Veiga  a,b

e Terezinha Inez Estivalet Svidzinski  a,b,*

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

^b Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

* Autor para correspondência.

E-mails: tiesvidzinski@uem.br, terezinha.svidzinski@gmail.com (T.I. Estivalet Svidzinski).

Recebido em 17 de outubro de 2024; aceito em 6 de novembro de 2024