



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

LÍVIA MARIA GALDINO PEREIRA

**PAPEL DO DNA EXTRACELULAR SOBRE A ESTRUTURA E RESPOSTA A
ANTIFÚNGICOS EM BIOFILMES DE *Trichosporon asahii* E *T. inkin* FORMADOS
EM MEIO SIMULADOR DE URINA E RPMI 1640**

FORTALEZA - CE

2022

LÍVIA MARIA GALDINO PEREIRA

**PAPEL DO DNA EXTRACELULAR SOBRE A ESTRUTURA E RESPOSTA A
ANTIFÚNGICOS EM BIOFILMES DE *Trichosporon asahii* E *T. inkin* FORMADOS
EM MEIO SIMULADOR DE URINA E RPMI 1640**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Micologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rossana de Aguiar Cordeiro

FORTALEZA - CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G149p Galdino Pereira, Livia Maria.
Papel do DNA extracelular sobre a estrutura e resposta a antifúngicos em biofilmes de *Trichosporon asahii* E T. inkin formados em meio simulador de urina e RPMI 1640 / Livia Maria Galdino Pereira. – 2023.
99 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Rossana de Aguiar Cordeiro.
1. Tricosporonose. 2. DNA Exonucleases. 3. Infecções do Sistema Urinário. I. Título.
CDD 616.9
-

LÍVIA MARIA GALDINO PEREIRA

**PAPEL DO DNA EXTRACELULAR SOBRE A ESTRUTURA E RESPOSTA A
ANTIFÚNGICOS EM BIOFILMES DE *Trichosporon asahii* E *T. inkin* FORMADOS
EM MEIO SIMULADOR DE URINA E RPMI 1640**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Micologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^ª. Dr^ª. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará - UFC

“Disciplina é a ponte que liga nossos sonhos às
nossas realizações”.

Pat Tilman

AGRADECIMENTOS

Em um sábado à noite, enquanto escrevia a discussão da tese, coloquei um show no *YouTube* da Maria Bethânia para escutar, pois a música me ajuda na concentração. Por coincidência, era o show “Abraçar e Agradecer”. Nesse momento, me senti tocada pelo som e palavras, parei a escrita da discussão e comecei a escrever os agradecimentos. Momento de abraçar todas as experiências e nada mais que agradecer.

Assim, começo agradecendo ao ventre que me gerou, a mulher forte e cuidadosa que me ensinou a lutar pelos meus objetivos e que tem dias com muita poeira, mas ela baixa e vista é expandida. Minha Mãe Socorro Pereira, que é quase um pedido, mas é muito mais um consolo, a senhora é meu incentivo diário de seguir em frente. Ao seu lado, fui sentindo o que é o amor de Deus, Aquele que me surpreende com cada pessoa que coloca em minha vida. Aquele com quem eu divido as minhas alegrias e angústias, no colo de vocês sempre será o meu melhor lugar.

Você minha Mãe, me trouxe em uma família sensacional, não por ser perfeita, mas que diante de todas as imperfeições, nós somos unidos, parceiros e amigos. Assim, agradeço a meu Pai Galdino Barbosa que me inspira pelo hábito diário a leitura, a escutar boa música e me ensinar que tudo tem seu tempo de acontecer. Agradeço por ter me dado meus maiores presentes, meus irmãos Janeandro Galdino, Pedro Galdino e Vitor Galdino, cada passo da minha história foi apoiado por vocês, não existiria o Eu sem vocês, meus maiores exemplos de irmandade, companheirismo e amor que agora transborda nos meus sobrinhos Kauai Galdino, Vinícius Galdino e Íris Galdino.

Nos últimos 8 anos, minha vida ganhou um novo pilar, mais um cuidado de Deus. A você meu amor Samuel Rocha, agradeço por sempre me fazer acreditar que eu consigo. Agradeço por você me cuidar e dividir dias tensos e dias de mar. Segurando sua mão, encontro força necessária para mais um dia.

Minha vida escolar foi regada de grandes exemplos de professores que me inspiraram. Alguns deles influenciaram nas minhas escolhas, como a Professora Michelle Paiva me inspirou a ser bióloga. Os professores Lydia Pantoja, Germana Paixão e Bruno Jaegger além de me apresentarem ao mundo invisível da Microbiologia me acolheram como amiga e me guiam nas escolhas atuais, meu eterno agradecimento por tanto.

Através deles, cai nos braços científicos de Rossana Cordeiro, que, com sua inteligência esplendorosa, me orientou em todos os passos desses dois lindos trabalhos, mestrado e doutorado. Com a senhora aprendi muito além do que está escrito nos livros de Microbiologia.

Agradeço por cada palavra trocada, que, por mais dolorida, foi processada, acolhida e aprendida. Agradeço a paciência e o cuidado.

Essa obra, não teria resultado sem os meus grandes parceiros de trabalho, de luta, de conversas, de risadas, de choros e superações. Meus amigos Fernando Portela, Kleybson Sousa e Raquel Colares vocês são além de suporte de bancada, são parte da construção dessa história. Não posso deixar de agradecer, também, ao Bruno Nascimento e Ana Luiza Aguiar, o trio *Trichosporon*. Mais recente, tive a honra de reencontrar minha outra metade da Microbiologia, Edlâny Milanez, minha “Di”, como vibrei em poder dividir mais esse momento com você, você me inspira muito. Completando a equipe “Ross”, agradeço a Mariana Pergentino, Pedro Manzi, Laína Silva, Letícia Chagas, Maria Vitoria, Paulo Henrique, Nicole Fiallo, Lua Silva e Júlia Oliveira, nossa equipe é fera.

Transcendendo a equipe “Ross” o CEMM me apresentou com grandes amigas, mulheres fortes e de luta. Gleyciane Rocha, Géssica Araújo, Lana Glerieide, Lara de Aguiar, como eu sou mais forte com nossas trocas. E assim, agradeço aos amigos que fiz, que mantêm coragem de gostar de mim, apesar de mim.

Fazendo parte da minha construção de conhecimento, agradeço a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica por dispor os melhores conteúdos para o preparo dos seus alunos. Agradeço aos professores que compuseram as bancas de qualificação, Professor Victor Carneiro e Professor Antônio Evangelista. Assim como os da defesa dessa tese, Professora Raquel Fontinelle, Professor Cleverson Freitas, Professor Vitor Lima Filho e Professor Edson Teixeira, vocês contribuíram significativamente para o engrandecimento desse trabalho.

Aos funcionários dessa instituição, que nos proporcionam um ambiente fluido para o desenvolvimento das nossas atividades. Seu João deixando nosso ambiente sempre limpo. Marcílio e Seu Valdemiro, que cuidam tão bem da nossa segurança.

Agradeço a Coordenação do Curso em nome da Professora Débora Castelo-Branco e vice coordenadora em nome da Professora Rossana Cordeiro, em proporcionar uma experiência tão rica para os alunos de Microbiologia Médica.

Agradeço a FUNCAP pela concessão da bolsa, que por alguns anos, me foi suporte. Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

Enfim, agradecer o que ter o que agradecer.

RESUMO

Fungos do gênero *Trichosporon* fazem parte da microbiota transitória e residente de humanos. Contudo, dependendo da condição imunológica dos pacientes, como em portadores de neoplasias hematológicas, esses fungos podem causar severas infecções, podendo levar a morte em até 90% dos casos. As infecções ocasionadas por *Trichosporon* spp. são, normalmente, associadas à formação de biofilmes em dispositivos médicos, como sondas urinárias do tipo foley e cateteres. Biofilmes são comunidades microbianas fortemente aderidas a uma superfície, protegidos por uma matriz extracelular autoproduzida, composta de água, proteínas, lipídios e DNA extracelular (eDNA). Apesar de todos esses componentes estarem associados ao processo de agregação celular e adesão às superfícies, o último apresenta um maior destaque. Ademais, as infecções do trato urinário em sítio anatômico bastante acometido por trichosporonose, principalmente por pacientes portadores de câncer hematológicos, doenças imunossupressoras, neutropênicos e portadores de HIV. Desse modo, este estudo teve por objetivo avaliar a influência do eDNA na formação e desenvolvimento correlacionando com sua sensibilidade aos antifúngicos. Adicionalmente, foi avaliado a influência de DNAses sobre a sensibilidade dos biofilmes maduros formados em meio RPMI 1640 e meio simulador de urina (MSU). Inicialmente, os biofilmes foram formados em placa de 96 poços de poliestireno a partir de uma suspensão de células (10^6 cél/mL) para posterior análise de biomassa, atividade metabólica, viabilidade celular e liberação de eDNA nos tempos 6, 24 e 30 h. Em seguida, foi avaliado a influência da adição de eDNA (1280 a 80 ng/mL) em diferentes etapas de formação dos biofilmes (0, 6, 24 e 30 h), bem como a ação da enzima DNase (2 a 0,25 mg/mL) combinada com anfotericina B (AMB 64 µg/mL para *T. asahii* e 8 µg/mL para *T. inkin*) e voriconazol (VRZ 64 µg/mL para ambas as cepas) sobre a estrutura e sensibilidade dos biofilmes fúngicos. Em segundo momento, biofilmes formados em MSU e RPMI foram comparados quanto à adição de eDNA (160 ng/mL) após 24, 48 e 72 h de incubação e posterior sensibilidade a AMB e VRZ nas mesmas concentrações acima. Os resultados demonstraram que os biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* liberaram eDNA à medida que aumentaram a atividade metabólica e biomassa em função do tempo. A morfologia e ultraestrutura dos biofilmes foram avaliadas com imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal a laser. A biomassa foi aumentada em até 50% quando adicionado eDNA no meio, também evidenciados pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura. Assim como, biofilmes formados com eDNA exógeno se tornaram mais tolerantes a AMB e VRZ. No tratamento com DNase (0,25 mg/mL) foi obtido biofilmes menos robustos e mais sensíveis aos antifúngicos testados, sendo observado desagregação celular nas imagens de microscopia confocal. Também percebeu-se que as cepas testadas de *Trichosporon* foram capazes de formar biofilme em MSU, evidenciados pela biomassa e microscopia eletrônica compatível com o crescimento em meio RPMI. Bem como, os biofilmes pré tratados com eDNA tanto tiveram biomassa aumentada (66% para *T. asahii* e 42% para *T. inkin*) quanto foram mais tolerantes aos antifúngicos no MSU. Dessa maneira, conclui-se que o eDNA é um componente essencial para várias etapas do desenvolvimento de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, podendo ser um possível alvo para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas.

Palavras-chave: Trichosporonose; Infecção do sistema urinário; DNA exonucleases.

ABSTRACT

Fungi of the genus *Trichosporon* are part of the transient and resident microbiota of humans. However, depending on the immunological condition of the patients, such as in patients with hematological malignancies, these fungi can cause severe infections, which can lead to death in up to 90% of cases. Infections caused by *Trichosporon* spp. are usually associated with the formation of biofilms on medical devices, such as urinary foley probes and catheters. Biofilms are microbial communities strongly adhered to a surface, protected by a self-produced extracellular matrix, composed of water, proteins, lipids and extracellular DNA (eDNA). Although all these components are associated with the process of cell aggregation and adhesion to surfaces, the latter is more prominent. In addition, urinary tract infections are an anatomical site that are very affected by trichosporonosis, mainly by patients with hematological cancer, immunosuppressive diseases, neutropenia and HIV carriers. Thus, this study aimed to evaluate the influence of eDNA on formation and development, correlating with its sensitivity to antifungal agents. Additionally, the influence of DNase on the sensitivity of mature biofilms formed in RPMI 1640 medium and urine simulating medium (MSU) was evaluated. Initially, biofilms were formed in a 96-well polystyrene plate from a cell suspension (10^6 cells/mL) for further analysis of biomass, metabolic activity, cell viability and eDNA release at times 6, 24 and 30 h. Then, the influence of adding eDNA (1280, 640, 320, 160 and 80 ng/mL) at different stages of biofilm formation (0, 6, 24 and 30 h) was evaluated, as well as the action of the enzyme DNase (2, 1, 0.5 and 0.25 mg/mL) combined with amphotericin B (AMB 64 μ g/mL for *T. asahii* and 8 μ g/mL for *T. inkin*) and voriconazole (VRZ 64 μ g/mL for both strains) on the structure and sensitivity of fungal biofilms. Secondly, biofilms formed on MSU and RPMI were compared regarding the addition of eDNA (160 ng/mL) after 24, 48 and 72 h of incubation and subsequent sensitivity to AMB and VRZ at the same concentrations above. The results demonstrated that *T. asahii* and *T. inkin* biofilms released eDNA as they increased metabolic activity and biomass as a function of time. The morphology and ultrastructure of biofilms were evaluated using scanning electron microscopy (SEM) and laser confocal microscopy. Biomass increased by up to 50% when eDNA was added to the medium, also evidenced by scanning electron microscopy images. Likewise, biofilms formed with exogenous eDNA became more tolerant to AMB and VRZ. In the treatment with DNase (0.25 mg/mL) biofilms were obtained that were less robust and more sensitive to the antifungals tested, with cellular disaggregation being observed in the confocal microscopy images. It was also noticed that the *Trichosporon* strains tested were able to form a biofilm in MSU, evidenced by the biomass and electron microscopy compatible with growth in RPMI medium. In addition, biofilms pretreated with eDNA both had increased biomass (66% for *T. asahii* and 42% for *T. inkin*) and were more tolerant to antifungal agents in the MSU. Thus, it is concluded that eDNA is an essential component for several stages of the development of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms, and may be a possible target for the development of antifungal strategies.

Keywords: Trichosporonose; Urinary System Infection; Exonucleases DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos históricos da identificação e taxonomia de espécies de <i>Trichosporon</i> ao longo dos anos	22
Figura 2	Características macroscópicas das colônias de <i>T. asahii</i> (A) e <i>T. inkin</i> (B). Cultivo em ágar batata, revelando colônias de coloração creme, textura cremosa a seca e relevo cerebriforme	23
Figura 3	Aspecto micromorfológicos de <i>Trichosporon</i> spp. por microscopia optica. (A) seta azul revela presença de blastoconídeo, seta vermelha presença de artroconídeo. (B) seta vermelha formação de hifas artroconidiadas e seta azul pseudo-hifas corados com lactofenol azul de algodão. Aumento 400x.....	24
Figura 4	Características de identificação fisiológica. (A) prova de urease evidenciando reação positiva, (B) cultivo em CHOMágar <i>Candida</i> evidenciando colônias cremes e meio de cultivo com coloração azul.....	25
Figura 5	Infecções superficiais causadas por <i>Trichosporon</i> . <i>Piedra</i> branca acometendo cabelo (A); Microscopia de uma infecção do pelo, mostrando nódulo externo ao pelo; (C) Onicomiose distal causada por <i>Trichosporon</i> spp.	27
Figura 6	Fatores de virulência associados à <i>Trichosporon</i> spp., principalmente <i>T. asahii</i> , para promover a penetração no tecido e desenvolver infecção	30
Figura 7	Estágios de desenvolvimento do biofilme. 1. Células planctônica; 2. Fixação reversível a superfície; 3. formação de microcolônias; 4. adesão irreversível com produção de matriz exopolissacarídica (EPS), e começo da comunicação entre as células mediada por moléculas do <i>Quorum sensing</i> ; 5. biofilme maduro com estrutura típica de cogumelo e 6. a dispersão de células para colonizar novos sítios. Em A, B, e C representa microscopia eletrônica de varredura do processo de adesão, maturação e biofilme maduro, respectivamente, de uma cepa de <i>T. asahii</i>	33

Figura 8	Fatores para o processo de adesão dos microrganismos a superfícies. Tríade de interação dos microrganismos, ambiente e material da superfície	34
Figura 9	Presença de eDNA nos estágios de adesão, maturação e dispersão de biofilmes microbianos	36
Figura 10	Diferentes mecanismos de liberação de DNA para o meio externo. 1. As células são sinalizadas para sofrerem lise e liberar DNA para o meio externo. 2. DNA é sintetizado e transportado para o meio extracelular através de vesículas. 3. Sinalização de prógafos que induzem as células a sofrerem lise e liberar DNA.	37
Figura 11	Esquema da liberação de eDNA através de lise celular mediada por profagos, fenazinas e várias autolisinas controladas por mecanismos de <i>Quórum sensing</i>	38
Figura 12	Papel da enzima DNase sobre a estrutura dos biofilmes	39
Figura 13	Organograma e estruturação experimental deste estudo	45
Figura 14	Atividade metabólica (barras cinzas), biomassa (barras brancas) e concentração de DNA na matriz extracelular (●) e sobrenadante (▲) dos biofilmes de <i>T. asahii</i> (A) e <i>T. inkin</i> (B). As medições foram feitas em 6 h, 24 h e 48 h de biofilmes formados em meio RPMI a 35°C. Diferenças estatisticamente significativas de atividade metabólica (δ), biomassa (&) e DNA sobrenadante (*) quando comparados aos biofilmes de 6 h (p < 0,05)	58
Figura 15	Efeito do eDNA exógeno na biomassa de <i>T. asahii</i> (A) e <i>T. inkin</i> (B) em biofilmes de 48 h. eDNA foi adicionado a 1280, 640, 320, 160 e 80 ng/mL (barras brancas) em diferentes intervalos de tempo (0, 6, 24 e 30h). *Diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle de crescimento (barras pretas) (p < 0,05)	59

Figura 16 Efeito da adição de eDNA na sensibilidade antifúngica dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* (barras brancas). Biofilmes foram formados em meio RPMI e tratados com eDNA (160 ng/mL) em diferentes intervalos de tempo (0, 6, 24 e 30 h). Biofilmes maduros de 48 h foram então avaliados quanto à tolerância antifúngica a AMB (A; C) e VRZ (B; D). *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparados aos biofilmes tratados com cada antifúngico (barras cinza). O controle de crescimento (barras pretas) foi formado em meio RPMI sem antifúngicos 61

Figura 17 Efeito da DNase na suscetibilidade antifúngica de biofilmes de *T. asahii* (A, B) e *T. inkin* (C, D). Os biofilmes foram tratados com DNase após 24 h de desenvolvimento em meio RPMI. Biofilmes maduros foram então desafiados com anfotericina B (AMB) e voriconazol (VRZ) e avaliados quanto à produção de biomassa (barras brancas). λ Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparados aos biofilmes maduros desafiados com cada antifúngico (barras cinza). * Indica diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado com controles de crescimento (barras pretas) formados em meio RPMI sem antifúngicos 62

Figura 18 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes de *T. asahii* (A-D) e *T. inkin* (E-H) em meio RPMI como controles (A, B, E, F) e RPMI suplementado com 160 ng/mL eDNA (C, D, G, H) em 24 h e 30 h de incubação. Ampliação: 3000x; barra: 40 μ m 63

Figura 19 Microscopia confocal a laser de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* tratados com 160 ng/mL eDNA após 24 h e 30 h de desenvolvimento em meio RPMI (A). Efeito de eDNA exógeno na biomassa e espessura dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* (B). * Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparados aos controles de crescimento sem eDNA 64

Figura 20 Microscopia confocal a laser de biofilmes maduros de *T. asahii* e *T. inkin* tratados com diferentes concentrações de DNase (A). Efeito da DNase na biomassa e espessura dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* (B). *Diferenças

	estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento sem DNase	66
Figura 21	Microscopia óptica do crescimento planctônico de <i>T. asahii</i> (CEMM 05-6-072) nos meios MSU e RPMI em diferentes horas de análise (24, 48, 72 e 96 h) corados pela técnica de Gram. Aumento de 400x, magnitude 100 μm	68
Figura 22	Microscopia óptica do crescimento planctônico de <i>T. inkin</i> (CEMM 05-6-074) nos meios MSU e RPMI em diferentes horas de análise (24, 48, 72 e 96 h) corados pela técnica de Gram. Aumento de 400x, magnitude 100 μm	69
Figura 23	Quantificação de biomassa e viabilidade celular de <i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072 (A e C) e <i>T. inkin</i> CEMM 05-6-074 (B e D) em MSU (barras brancas) em comparação com meio RPMI (barras cinzas) nos tempos 24, 48, 72 e 96 h de cultivo. *Diferença estatística em comparação do crescimento em MSU e RPMI	70
Figura 24	Efeito do eDNA na biomassa de <i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072 em A e <i>T. inkin</i> CEMM 05-6-74 em B cultivados em MSU e RPMI analisados após 96 h de cultivo. eDNA foi adicionado na concentração de 160 ng/mL nos tempos de 24, 48 e 72 h de cultivo. * Diferença estatística significativa comparada com o controle (barras pretas)	71
Figura 25	Efeito da adição de eDNA na sensibilidade dos biofilmes de <i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072 e <i>T. inkin</i> CEMM 05-6-074 (barras brancas). Os biofilmes foram formados em MSU e meio RPMI pré-expostos a eDNA (160 ng/mL) em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 h). Após o biofilme maduro com 96 h foi desafiado com antifúngicos AMB (A e B) e VRZ (C e D). *Diferença estatística em comparação ao biofilme tratado com antifúngico (barras cinzas). Controle de crescimento (barras pretas) foi formado em meio MSU e RPMI livre de eDNA e antifúngico	72

Figura 26	Imagem de MEV de biofilme de 96 h de <i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072 em MSU e RPMI sem eDNA (A e B / E e F) e após adição de eDNA (160 ng/mL) com 72 h de cultivo (C e D / G e H). Magnitude de 1000x; bar 100 µm; Magnitude de 5000x; bar 20 µm	73
Figura 27	Imagem de MEV de biofilme de 96 h de <i>T. inkin</i> CEMM 05-6-074 em MSU e RPMI sem eDNA (A e B / E e F) e após adição de eDNA (160 ng/mL) com 72 h de cultivo (C e D / G e H). Magnitude de 1000x; bar 100 µm; Magnitude de 5000x; bar 20 µm	74
Figura 28	Microscopia confocal a laser de biofilmes de <i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072 de 96 h tratados com 160 ng/mL eDNA com 72 h de desenvolvimento em meio MSU e RPMI (A). Efeito do eDNA exógeno na biomassa e espessura dos biofilmes de <i>T. asahii</i> (B). *Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) quando comparado ao controle de crescimento sem eDNA	75
Figura 29	Microscopia confocal a laser de biofilmes de <i>T. inkin</i> CEMM 05-6-074 de 96 h tratados com 160 ng/mL eDNA com 72 h de desenvolvimento em meio MSU e RPMI (A). Efeito do eDNA exógeno na biomassa e espessura dos biofilmes de <i>T. inkin</i> (B). *Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) quando comparado ao controle de crescimento sem eDNA	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes do meio simulador de urina	54
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
eDNA	Ácido Desoxirribonucléico extracelular
GXM	Glucoronoxilomanana
IGS	<i>Intergenic Spaces</i>
ITS	<i>Internal Transcriber Spacer</i>
KOH	Hidróxido de Potássio
MSU	Meio Simulador de Urina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
VRZ	Voriconazol
XTT	Sal de Tetrazólio – {2,3-bis (2-metoxi-4nitro-5-sulfo fenil) -5- [(fenilamino)carbonil]-2H hidróxido de tetrazólio}

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Gênero <i>Trichosporon</i>: aspectos históricos e taxonomia	22
2.2	Características gerais e identificação laboratorial	22
2.3	Infecções causadas pelo gênero <i>Trichosporon</i>	27
2.4	Fatores de virulência de <i>Trichosporon spp.</i>	30
2.5	Biofilmes	33
2.6	DNA extracelular em biofilmes	37
3	PERGUNTAS DE PARTIDA	41
4	HIPÓTESES	42
5	OBJETIVOS	43
5.1	Objetivo geral	43
5.2	Objetivos específicos	43
6	METODOLOGIA	44
6.1	Desenho experimental	44
6.2	Local de estudo	46
6.3	Microrganismos	46
6.4	Drogas antifúngicas	46
6.5	DNA extracelular	47
	<u>1ª PARTE EXPERIMENTAL</u>	
6.6	Caracterização dos biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	47
6.6.1	Biomassa	47
6.6.2	Atividade metabólica	48
6.6.3	Viabilidade celular	48
6.6.4	Quantificação de ácidos nucléicos	49
6.7	Efeito do eDNA nos biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	49
6.7.1	Adição de eDNA nos biofilmes	49
6.7.2	Efeito dos tratamentos com eDNA e DNase na sensibilidade do biofilme a antifúngicos	50
6.8	Morfologia e ultraestrutura dos biofilmes	50
6.8.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	50

6.8.2	Microscopia Confocal a Laser	51
6.9	Análise estatística	51
	<u>2ª PARTE EXPERIMENTAL</u>	
7	Material e Método	52
7.1	Microrganismos	52
7.2	Meios de cultivo	52
7.3	Preparação dos antifúngicos e eDNA	53
7.4	Cinética de crescimento planctônico	54
7.5	Biomassa e viabilidade celular de biofilme de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> em MSU e RPMI	54
7.6	Efeito do eDNA na biomassa dos biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	
7.7	formados em MSU e RPMI	55
	Sensibilidade antifúngica após adição de eDNA	55
7.7.1	Morfologia e ultraestrutura de biofilme de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> em MSU	
7.8	e RPMI	56
7.8.1	Microscopia eletrônica de varredura e confocal	56
7.9	Análise estatística	57
8	RESULTADOS	58
	<u>1ª PARTE EXPERIMENTAL</u>	
8.1	Cinética de liberação de eDNA durante a desenvolvimento dos biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	58
8.2	Efeito da adição de eDNA exógeno no desenvolvimento de biofilmes de <i>Trichosporon</i>	59
8.3	Efeito do tratamento com eDNA na sensibilidade antifúngica de biofilmes de <i>Trichosporon</i>	60
8.4	Efeito do tratamento com DNase na sensibilidade antifúngica de biofilmes de <i>Trichosporon</i>	61
8.5	Efeito do eDNA exógeno Morfologia e Ultraestrutura dos biofilmes de <i>Trichosporon</i>	63
8.5.1	Microscopia eletrônica de varredura	63
8.5.2	Microscopia Confocal a Laser	64
8.6	Efeito da DNase na Ultraestrutura dos biofilmes de <i>Trichosporon</i>	65
	<u>2ª PARTE EXPERIMENTAL</u>	

9	RESULTADOS	67
9.1	Cinética de crescimento planctônico	67
9.2	Cinética de formação de biofilme de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> em MSU em comparação a RPMI	68
9.3	Efeito do eDNA nos biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> formados em MSU e RPMI	69
9.4	Efeito do eDNA na sensibilidade antifúngica de biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> formados em MSU e RPMI	69
9.5	Morfologia e ultraestrutura de biofilme de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> em MSU e RPMI	70
9.5.1	Microscopia eletrônica de varredura	70
9.5.2	Microscopia confocal a laser	72
10	DISCUSSÃO	75
11	CONCLUSÃO	81
12	REFERÊNCIAS	82
13	ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

Trichosporon spp. são fungos basidiomicetos com caráter pleomórfico, caracterizado pela formação de arthroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas (BENTUBO et al., 2013). Podem ser encontrados no solo, água, fezes de animais, como também fazendo parte da microbiota da pele, trato gastrointestinal e trato respiratório superior de humanos (MILAN et al. 2018; MALACRIDA et al. 2021).

Apesar desse gênero ser comumente relatado como agente causador de infecções cutâneas de fácil tratamento como *pie*dra branca, nos últimos anos, este gênero tem sido associado às infecções sistêmicas, como pneumonias, endocardites e infecção do trato urinário, principalmente em pacientes imunocomprometidos, podendo atingir índice de mortalidade de até 90%, sobretudo nos casos de doenças neutropênicas e uso prolongado de corticosteroides (DINIZ e FILHO DE SOUZA, 2005; ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; GUO et al. 2019).

Nos últimos anos, é crescente os relatos de isolados de espécies *Trichosporon* em infecções relacionadas à assistência à saúde, principalmente infecções do trato urinário, em paciente com uso de sonda de demora, cateteres urinários, associado com algumas doenças de base como hipertensão, diabetes e doenças hematológicas malignas (TAVERNA et al., 2014; URS et al., 2018; LI et al., 2020). Recentemente, em pacientes acometidos pela COVID-19, observou-se altos índices de infecções do trato urinário causada por *Trichosporon asahii* (CRONYN et al., 2021). A espécie *T. asahii* é a principal causa de tricosporonose invasiva e está, geralmente, associada a formação de biofilmes de dispositivos médicos (GHÉHO et al., 1994; BENTUBO et al., 2013; CORDEIRO et al., 2021; MALACRIDA et al. 2021).

Os biofilmes se caracterizam por células microbianas sésseis fortemente aderidas e protegidas por uma matriz extracelular rica em água e composta por várias substâncias poliméricas (SUGIMOTO et al., 2018). Por muitos anos, acreditou-se que os exopolissacarídeos eram os componentes principais da matriz dos biofilmes, mas nas últimas décadas tem se destacado um papel ativo funcional dos ácidos nucléicos, principalmente DNA, no desenvolvimento e aumento da tolerância dos biofilmes aos antifúngicos (WU, XI, 2009; OKSHEVSKY, MEYER, 2013; SUGIMOTO et al., 2018).

Estudos relatam duas formas de liberação de DNA extracelular (eDNA) para o meio externo. A primeira ocorre por meio de lise celular, no qual uma subpopulação é sinalizada por mecanismos de *quorum sensing* para sofrer autólise, disponibilizando o DNA para a matriz extracelular (BANDARA et al., 2012; DAS et al., 2013). Além disso, outro processo se dá pela

liberação de DNA por mecanismos de secreção ativa, por meio de vesículas, com a finalidade de formar a matriz extracelular dos biofilmes. A sequência desse DNA é diferente do DNA genômico, elucidando que não é proveniente de lise celular e sim sintetizado com uma função específica de ser lançado para o meio externo e compor a matriz (WHITCHURCH et al., 2002; WU, XI, 2009; MARTINS et al., 2010).

O eDNA presente no biofilme era retratado superficialmente por muitos pesquisadores, havia poucas informações quanto a sua importância nas etapas de desenvolvimento do biofilme. Até que Whitchurch et al., (2002); Martins et al., (2010) e Montanaro et al., (2011) relataram que o eDNA encontrado na matriz modula o processo de formação dos biofilmes, estimulando a agregação celular, deixando-os mais robustos e com as células fortemente aderidas, tanto entre si quanto na superfície. Além disso, o eDNA possui um papel importante no mecanismo de transferência horizontal de genes, otimizando uma rápida propagação de genes de resistência a antimicrobianos quando exposta à pressão seletiva de tratamentos clínicos e sinalização dos genes dos fatores de virulência (MONTANARO et al., 2011; MONTOYA et al. 2018).

A capacidade de produção de fatores de virulência e de formação de biofilme em cepas do gênero de *Trichosporon* confere, principalmente, maior habilidade de causar infecções e maior tolerância aos antifúngicos de uso terapêutico, como caspofungina, azólicos e anfotericina B (CORDEIRO et al., 2015; MONTOYA et al. 2018), mesmo em sítios anatômicos com condições, normalmente, pouco favoráveis como o trato urinário. Com isso, tornam-se necessários maiores estudos para minimizar os impactos causados por esses microrganismos no organismo humano, bem como ao uso de drogas antimicrobianas.

Embora o eDNA seja um componente abundante na matriz, sua real função ainda não é bem estabelecida, principalmente para células fúngicas do gênero *Trichosporon*. Diante disso, espera-se que esse estudo estimule novos questionamentos que possam melhorar a compreensão *in vitro* do papel do eDNA para os biofilmes de *Trichosporon*, mesmo em diferentes substratos nutricionais como o meio RPMI 1640 e o meio simulador de urina (MSU).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Trichosporon*: aspectos históricos e taxonomia

Ao longo dos anos, houveram diversos ajustes na identificação e taxonomia de *Trichosporon* spp.. O primeiro relato de uma espécie de *Trichosporon* foi em 1865 por Beigel, que observou nódulos em cabelos de uma peruca, no qual chamou de *Sclerotium beigeli* (SIDRIM; ROCHA, 2004; VAZQUEZ, 2010). A denominação *Trichosporon* é uma derivação do grego, o qual “*trichos*” significa cabelo e “*sporon*” representa esporos (ROBLES-TENÓRIO et al. 2020). Este microrganismo está relacionado à presença de nódulos claros e irregulares ao longo do cabelo, comum nos quadros de *pedra* branca (COLOMBO et al., 2011).

Em 1902, Vuillemin propôs a denominação de *Trichosporon beigeli* ao observar um quadro clínico de *pedra* branca em pelos de bigode semelhante àquele descrito por Beigel (SIDRIM, ROCHA, 2004). Em 1909, Beurmann, dermatologista e micologista, cultivou raspados de uma lesão cutânea e identificou um fungo com características parecidas, o qual designou o isolado como *Oidium cutaneum*, que posteriormente foi renomeado de *Trichosporon cutaneum* por ter sido isolado de pele (COLOMBO et al, 2011). No entanto, por muitos anos, *T. beigeli* e *T. cutaneum* foram considerados sinônimos, em que os médicos denominavam *T. beigeli* e os micologistas ambientais chamavam de *T. cutaneum* (GUÉHO; DE HOOG e SMITH, 1992; COLOMBO et al, 2011). Assim, o gênero *Trichosporon* correspondia a uma coleção de leveduras com morfofisiologia similares incluídas sob o nome de *T. beigeli*.

Posteriormente, em 1992, estudos conduzidos por Eveline Guého propôs a revisão da taxonomia do gênero *Trichosporon*. Assim, com o advento das técnicas moleculares mais avançadas, analisando as sequencias parciais de RNA ribossomal 26S, esses organismos se mostraram geneticamente distintos, sendo, portanto, reorganizados diferentes espécies. O gênero foi subdividido em 5 clados: *cutaneum*, *ovoides*, *brassicae*, *gracile* e *porosum*, compreendendo 51 espécies de *Trichosporon* (COLOMBO et al., 2011; TAVERNA, 2014; MARINÉ et al., 2015).

Posteriormente, um estudo realizado por Liu e colaboradores (2015), reavaliaram a classe Tremellomycetes que resultou em alteração taxonômica na família Trichosporonacea.

Estudos taxonômicos baseados nas sequências de rDNA de IGS1 identificaram quatro gêneros dessa família, os quais foram denominados de *Cutaneotrichosporon*, *Trichosporon*, *Apiotrichum* e *Vanrija*. Algumas espécies que pertenciam ao gênero *Trichosporon* agora fazem parte de outro gênero da família Trichosporonacea (LIU et al., 2015; DE FRANCISCO et al., 2019). Atualmente o gênero *Trichosporon* é dividido em 12 espécies, sendo *T. asahii*, *T. inkin*, *T. faecale*, *T. ovoides*, *T. mucoides* e *T. asteroides* as clinicamente relevantes (Figura 1) (LIU et al. 2015; de FRANCISCO et al. 2019; GUO et al. 2019; MALACRIDA et al. 2021).



Figura 1: Aspectos históricos da identificação e taxonomia de espécies de *Trichosporon* ao longo dos anos. Fonte: Autoria própria (2022).

2.2 Características gerais e identificação laboratorial

Os fungos do gênero *Trichosporon* são pertencentes ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Tremellomycetes, ordem Trichosporonales e família *Trichosporonaceae* (TAVERNA et al. 2014). São predominantemente leveduriformes e amplamente distribuídos na natureza. Podem ser encontrados no solo, água, madeiras em decomposição, excrementos de pássaros, morcegos e bovinos. (VAZQUEZ, 2010; MARINÉ et al., 2015; MALACRIDA et al, 2021). Em humanos, podem fazer parte da microbiota transitória da pele e trato respiratório superior, como também da microbiota residente do trato gastrointestinal e cavidade oral (COLOMBO et al., 2011; TAVERNA et al., 2014; KHAN, et al., 2015).

Espécies do gênero *Trichosporon*, quando cultivadas em meio Sabouraud dextrose, formam culturas com colônias com característica leveduriforme, com matriz de coloração que variam de brancas a bege, textura cremosa a seca e com aspecto característico com sulcos cerebriformes radiados na superfície da colônia (Figura 2^a e 2B). Na rotina laboratorial, essas características macroscópicas, não são suficientes para distinguir entre as espécies, como também são muito confundidas com espécies do fungo *Geotrichum* (VAZQUEZ, 2010; COLOMBO et al, 2011; BENTUBO et al, 2013; MONTOYA et al., 2015).

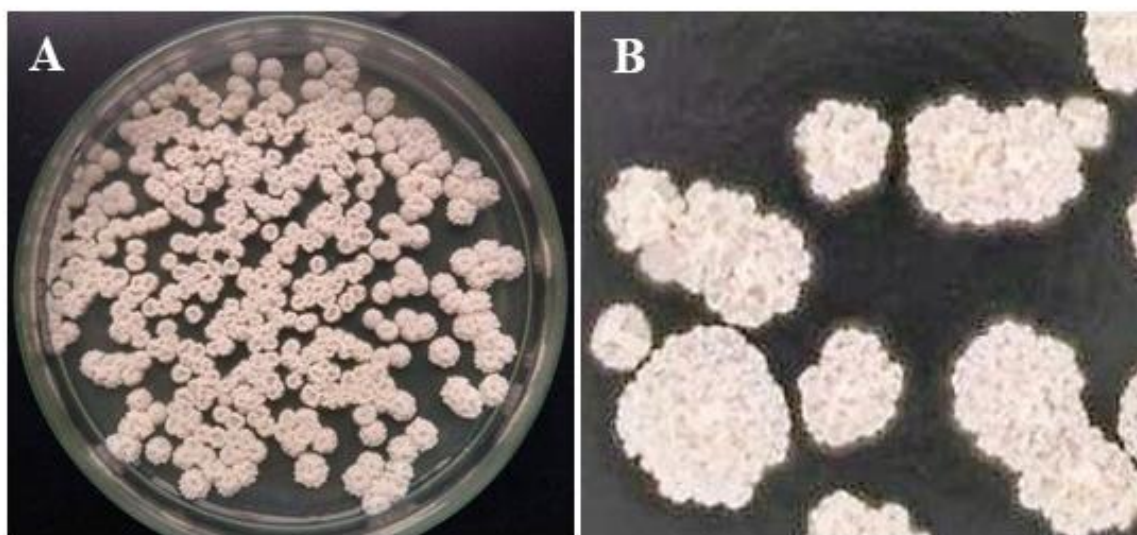


Figura 2: Características macroscópicas das colônias de *T. asahii* (A) e *T. inkin* (B). Cultivo em ágar batata, revelando colônias de coloração creme, textura cremosa a seca e relevo cerebriforme. Fonte: Autoria própria (2022).

A análise microscópica da fase assexuada é caracterizada pela presença de blastoconídios, arthroconídios, que são estruturas assexuadas que se desprendem das hifas verdadeiras, bem como clamidoconídeos, estruturas de paredes espessas e arredondadas (Figura 3A). É possível evidenciar pseudo-hifas e hifas arthroconidiadas hialinas (Figura 3C). Entretanto, outras espécies possuem estruturas que as diferem morfológicamente, como apressório, macroconídio ou conidiação meristemática (GUÉHO et al., 1994; CHOWDHARY et al., 2004; SUGITA, 2004; CHAGAS-NETO et al., 2008; COLOMBO et al, 2011; BENTUBO et al., 2013).

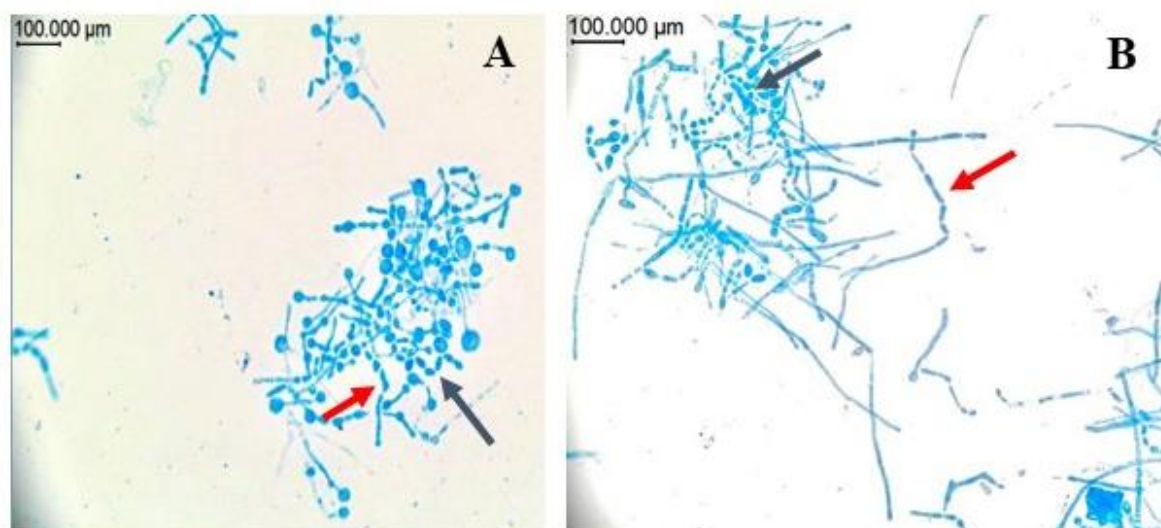


Figura 3: Aspecto micromorfológicos de *Trichosporon* spp. por microscopia óptica. (A) seta azul revela presença de blastoconídeo, seta vermelha presença de arthroconídeo. (B) seta vermelha formação de hifas arthroconidiadas e seta azul pseudo-hifas corados com lactofenol azul de algodão. Aumento 400x. Fonte: Autoria própria (2022).

Na identificação por métodos fisiológicos e bioquímicos, todas as espécies de *Trichosporon* são capazes de assimilar diferentes carboidratos como fonte de carbono, como glicose, lactose, galactose, trealose e maltose. Também hidrolisam a ureia, virando a coloração de pH de amarelo para rosa, indicação de ser um basidiomiceto (Figura 4A). Porém, os membros desse gênero não são capazes de fazer fermentação (ARAUJO; MARQUES, 2010; CHAGAS-NETO et al., 2008; VAZQUEZ, 2010; COLOMBO et al, 2011; MONTOYA et al., 2014; MONTOYA et al., 2015). Já quando cultivadas em meio CHORMAger *Candida*, apresentam colônias de cor creme e o meio fica de cor azul (Figura 4B). Algumas espécies do referido gênero apresentam tolerância a cicloheximida, crescendo em meios de cultivo com concentração de 0,1% do composto (MONTOYA et al., 2015).

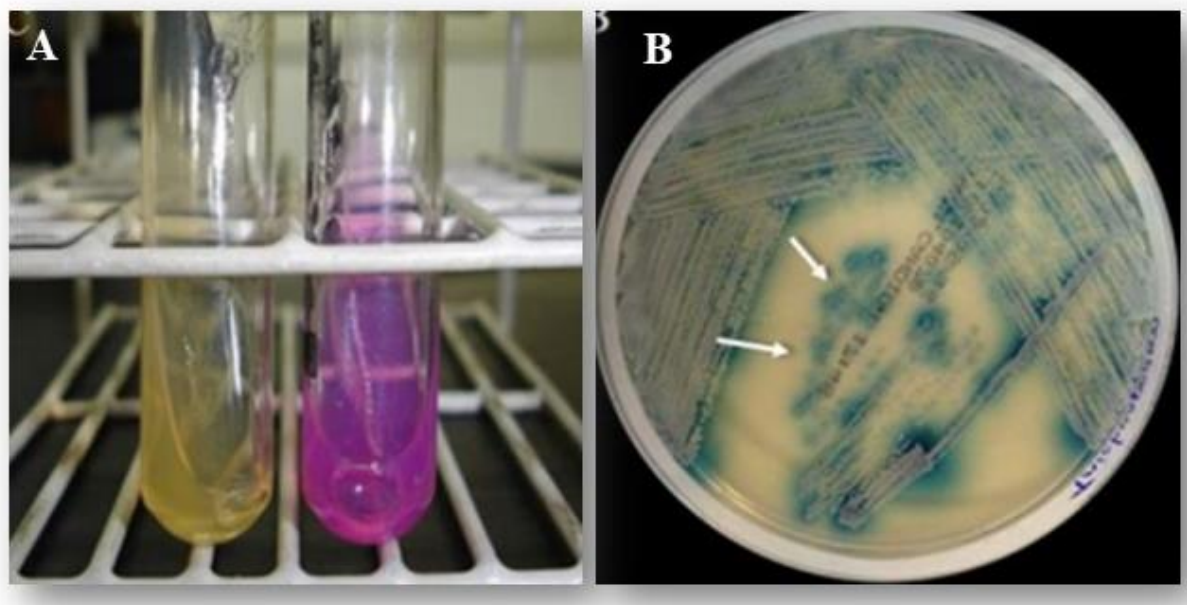


Figura 4: Características de identificação fisiológica. (A) prova de urease evidenciando reação positiva, (B) cultivo em CHOMágar *Candida* evidenciando colônias cremes e meio de cultivo com coloração azul. Fonte: Autoria própria (2022).

A identificação de espécies de *Trichosporon* baseada nas técnicas fenotípicas, características macro e micromorfológicas, fisiologia e, até mesmo, por métodos comerciais como API 20 C AUX e Vitek 2 Compact (Biomérieux®, Marcy l’Etoile, França) geram resultados inconsistentes, havendo muita controvérsia devido as semelhanças entre as espécies (GUO et al., 2019). Mais recente, o uso da espectrometria de massa de ionização por dessorção a laser assistida por matriz de tempo de voo (MALDI-TOF MS), tem se tornado um método rápido e preciso, porém, com a limitação de incluir apenas algumas espécies e alto custo de implantação (FRANCISCO et al., 2019; GUO et al., 2019).

Assim, para a identificação precisa, sugerem-se técnicas moleculares para análise das regiões intergênicas do DNA ribossômico e da sequência 26S do DNA ribossômico, além da quantificação de guanina-citosina (mol% G-C). Os genes ribossomais são alvos de regiões de conservação evolutiva, cujas regiões pesquisadas são as IGS (*Intergenic Spaces*) e ITS (*Internal Transcriber Spaces*) das subunidades 26S e 5S do RNA ribossomal (CHAGAS-NETO et al., 2008; COLOMBO et al., 2011; LIU et al., 2015; MALACRIDA et al., 2021).

Como o perfil de sensibilidade pode variar de acordo com as espécies, a identificação de *Trichosporon* spp. é de fundamental importância para ajudar nos parâmetros

epidemiológicos e definir a associação clínica com o tratamento a antifúngicos (COLOMBO et al., 2011; TAVERNA et al., 2014). Dados da literatura mostram resistência de *T. asahii* aos azólicos e anfotericina B (AMB) – droga considerada padrão-ouro no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, sendo consideradas patógenos multirresistentes (MONTROYA et al., 2015; MALACRIDA et al., 2021). Além disso, as outras espécies de relevância clínica, como *T. inkin*, *T. cutaneum*, *T. ovoides*, parecem ser mais resistentes *in vitro* a agentes triazólicos em comparação a AMB (TAVERNA et al., 2014). Voriconazol é o agente antifúngico mais adequado para o manejo de infecções invasivas por *Trichosporon*, além da remoção dos cateteres venosos centrais e a recuperação da neutropenia para o restabelecimento de pacientes com tricosporonose invasiva (MALACRIDA et al. 2021).

2.3 Infecções causadas pelo gênero *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* corresponde a fungos que fazem parte da microbiota humana, porém, pelas características imunológicas do hospedeiro e do perfil de virulência do patógeno, esses fungos podem causar infecções oportunistas. Contudo, os primeiros relatos de *Trichosporon* spp. como agentes primários de infecções humanas foram atribuídos a infecções superficiais, como a *pedra* branca e à onicomicose (COLOMBO et al., 2011; MONTROYA et al., 2014; ESCARRÁ et al., 2017).

Piedra branca é uma infecção fúngica crônica, benigna e assintomática que pode acometer a cutícula dos pelos das axilas, barba, bigode, áreas genitais e couro cabeludo, como observado na Figura 5A. Os nódulos são de fácil remoção ao redor do pelo de coloração branca a amarela, afetando primordialmente crianças e adultos jovens (COLOMBO et al., 2011; CASTANO et al., 2022). O fungo utiliza o pelo somente como suporte de crescimento, sem danificar a matriz pilosa, caracterizando uma infecção ectotrix (Figura 5B) (MARINÉ et al., 2015). A manifestação da infecção não apresenta predileção por grupos étnicos, sexo ou idade, mas está diretamente relacionado com as condições higiênico-sanitárias dos pacientes (SIDRIM; ROCHA, 2004; DINIZ; FILHO DE SOUZA, 2005; ARAÚJO; MARQUES, 2010). Espécies como *T. ovoides* e *T. inkin* são as mais isoladas em infecções de *Piedra* branca, com casos mais frequentes na região Norte do Brasil (SINGH et al., 2019).

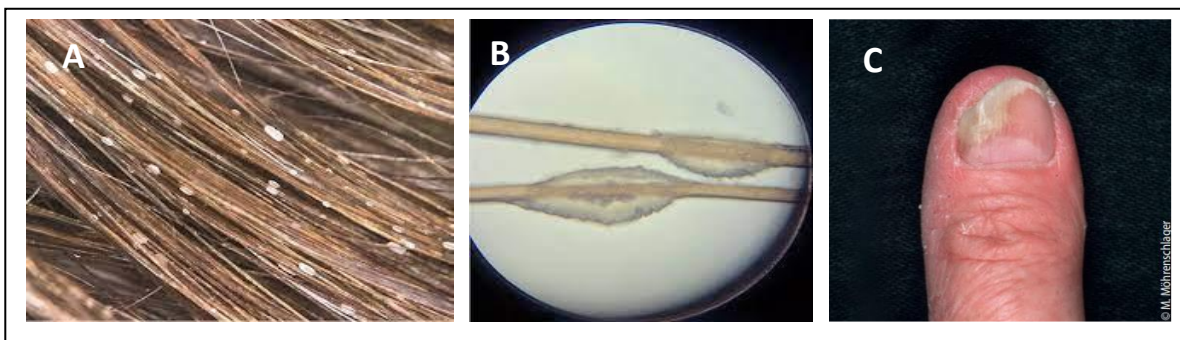


Figura 5: Infecções superficiais causadas por *Trichosporon*. Piedra branca acometendo cabelo (A); Microscopia de uma infecção do pelo, mostrando nódulo externo ao pelo; (C) Onicomicose distal causada por *Trichosporon* spp.. Fonte: MÖHRENSCHLAGER, 2019; FERREIRA et al. 2019.

A onicomicose é uma infecção que acomete o tecido queratinizado da unha que, por muitas vezes, pode estar associada aos fungos dermatófitos, como espécies de *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporon*. Contudo, *Trichosporon* spp. também pode ser o agente etiológico responsável por até 40% destas infecções, nas quais as espécies mais isoladas são *T. cutaneum* e *T. ovoides* (CHAGAS-NETO et al., 2008; COLOMBO et al., 2011; MARINÉ et al., 2015; ANDRADE et al., 2020).

Nos últimos anos, o gênero *Trichosporon* ganhou notoriedade pelo seu crescente isolamento em infecções sistêmicas, representando a segunda infecção fúngica não-*Candida* mais comuns em infecções invasivas (SADAMOTO et al. 2020; MALACRIDA et al. 2021). Em pacientes com alguma debilidade imunológica a taxa de mortalidade pode chegar a 90%, sendo considerado um sério problema para a saúde pública (COLOMBO et al. 2011; MALACRIDA et al. 2021). Infecções por *Trichosporon* estão, normalmente, relacionadas ao uso de dispositivos médicos, causando infecções sanguíneas, pneumonias e infecções do trato urinário (BENTUBO et al.; 2014; TAVERNA et al., 2014; ESCARRÁ et al., 2017; MALACRIDA et al., 2021).

Infecções do trato urinário causada por espécies do gênero *Trichosporon* era considerada uma infecção rara (KHAN et al. 2015; URS et al. 2018). Porém, é crescente o isolamento de *Trichosporon* spp. em infecções invasivas (LI et al., 2020; CASTANO et al., 2022) e mais recentemente com o advento da COVID-19, em pacientes com longos períodos de internações, uso profilático de antibióticos, uso de cateteres e sondas urinárias, observou-se altos índices de isolamento de *Trichosporon* spp. causando infecções do trato urinário, principalmente, a espécie *T. asahii* (CRONYN et al., 2021).

Dentre as condições do grupo de risco para tricosporonose, encontra-se os pacientes com neoplasia, neutropênicos, recém-nascidos com baixo peso, prematuros e portadores de HIV (CASTANO et al, 2022). Assim como, pacientes que fizeram cirurgias de válvulas cardíacas, transplantados de fígado e pacientes com insuficiência renal que estão em diálise (ESCARRÁ et al., 2017; ANDRADE et al., 2020; CASTANO et al., 2022). Esses são os fatores mais comuns predisponentes de desenvolvimento de infecções pelo gênero *Trichosporon*.

Existem duas apresentações clínicas de tricosporonose, a localizada e a disseminada. A primeira forma se caracteriza por acometer apenas um único órgão ou sistema, como válvulas cardíacas. Já a segunda forma se destaca por acometer vários órgãos com disseminação hematogênica, como infecções do sistema nervoso central (MARINÉ et al. 2015; DE FRANCISCO et al. 2019; CASTANO et al., 2022).

Dados epidemiológicos mostram que *T. inkin* é a segunda espécie mais associada a tricosporonose invasiva, sendo isolada de amostras clínicas como urina, sangue e cateteres (ARAÚJO, MARQUES, 2010; SILVESTRE et al., 2010; ALMEIDA JÚNIOR & HENNEQUIN, 2016; MILAN et al. 2018). Contudo, outras espécies têm sido relatadas causando infecções invasivas, como *T. mucoides*, *T. asteroides*, *T. japonicum* e *T. ovoides* (ARAÚJO; MARQUES, 2010; TAVERNA et al., 2014; BONGOMIN et al. 2019).

Entretanto, as infecções invasivas representam um desafio, pois não há padronização terapêutica (MILAN et al. 2020). Vários estudos relatam que o tratamento das infecções por *T. asahii* tem pouco sucesso com a administração de anfotericina B e caspofungina (VAZQUEZ, 2010; MARINÉ et al., 2015; CONG et al., 2016, MALACRIDA et al. 2021). Assim como, cepas de *T. asahii* podem estar relacionadas com resistência intrínsecas a diversos antifúngicos (GUO et al., 2011) e poder ser 2 vezes mais resistência a anfotericina B do que as espécies não-*T. asahii*, o que pode estar associado a altas taxas de mortalidade (GUO et al. 2019; PADOVAN et al., 2019).

Os novos antifúngicos azólicos, como o voriconazol, mostraram ótima eficiência para o tratamento de tricosporonose invasiva. Uma vez que apresentam boa atividade tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra espécies de *Trichosporon*. Contudo, o alto custo desses medicamentos limita seu uso na clínica (MARINÉ et al., 2015; CONG et al., 2016; GUO et al. 2019; MALACRIDA et al. 2021).

2.4 Fatores de virulência de *Trichosporon* spp.

Alguns fungos são agentes patogênicos oportunistas, os quais deixam de ser comensais e passam a causar doenças quando ocorre alteração na homeostase do hospedeiro (SUN et al., 2012). Além de possuir vários mecanismos de virulência que permitem a sua penetração, instalação e disseminação dentro do hospedeiro, o que podem facilitar o estabelecimento da infecção (MONTOYA et al., 2015; BENTUBO et al., 2014).

Esses fatores de virulência são, normalmente, relacionados à alterações morfológicas, formação de biofilme, termotolerância, expressão de componentes da parede celular, formação de cápsula, secreção de enzimas e expressão de genes de resistência à antifúngicos (COLOMBO et al., 2011; BENTUBO et al., 2014; GALDIERO et al., 2020; CSATANO et al., 2022). Embora, o gênero *Trichosporon* seja a segunda levedura mais comum relacionada a infecções sistêmicas, são poucos os estudos que caracterizam seus fatores de virulência (CHAGAS-NETO et al., 2008; BENTUBO et al., 2014. MONTOYA et al., 2019).

Contudo, alguns fatores de virulência têm sido descritos em espécies de *Trichosporon*. Além da ocorrência de *switching* fenotípico (transição de blastoconídios para hifas), relatado como um importante fator associado a adesão celular (ICHIKAWA et al., 2004), pode-se observar: a presença de glucuronoxilomanana (GXM) na parede celular, a produção de exoenzimas e melanina (BENTUBO et al., 2014; CORDEIRO et al., 2019). Adicionalmente, *Trichosporon* spp. possui uma intensa capacidade de formação de biofilmes, com destacada resistência a antifúngicos e agentes oxidantes, compondo um dos principais mecanismos de virulência produzidos por espécies desse gênero (Figura 6) (CORDEIRO et al., 2015).

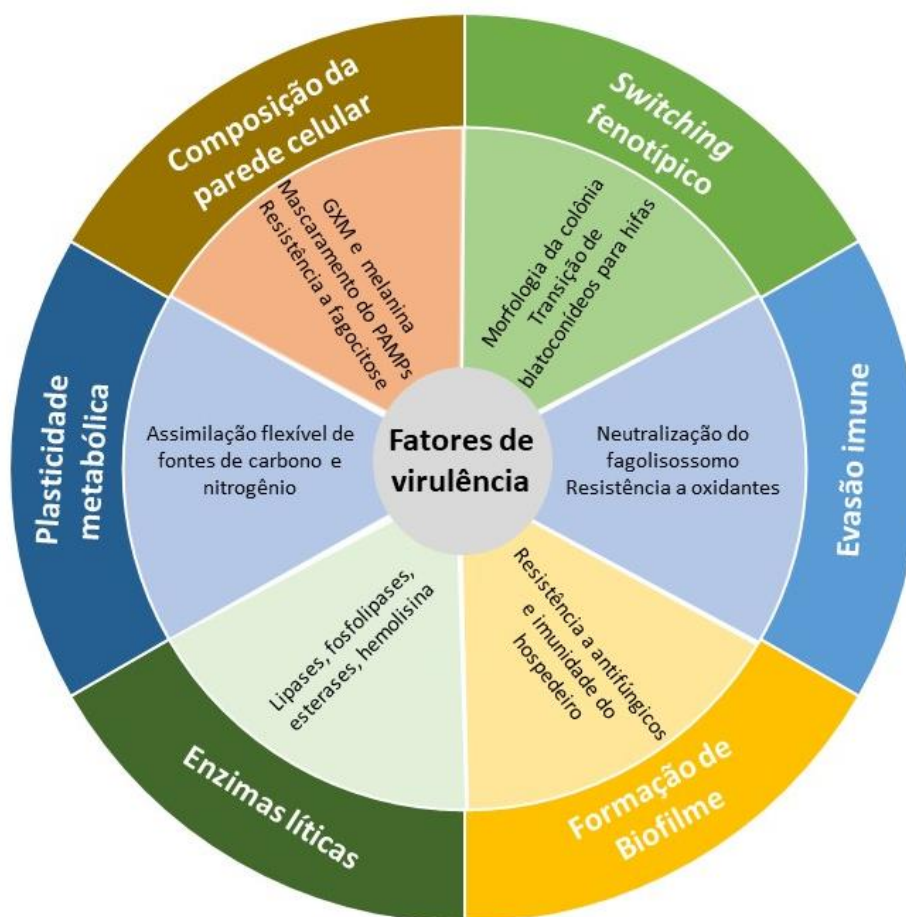


Figura 6: Fatores de virulência associados à *Trichosporon* spp., principalmente *T. asahii*, para promover a penetração no tecido e desenvolver infecção (Adaptado de DUARTE- OLIVEIRA et al., 2017).
*GMX – Glucuroxilomanana; PAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno.

O principal objetivo na produção dos fatores de virulência é a sobrevivência da levedura, evitando a ação do sistema imunológico e contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade dos hospedeiros (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; MONTOYA et al., 2019). Nenhum desses fatores parece ser individualmente responsável pela patogenicidade do fungo, porém as combinações dos mesmos atuam determinando a gravidade e as fases da infecção (CHOW et al., 2012; BENTUBO et al., 2014; MONTOYA et al., 2015).

A conversão de blastoconídios em hifas durante a infecção invasiva (*switching* fenotípico), assim como em *Candida albicans*, está fortemente associado à virulência de *Trichosporon* spp.. Esse fator facilita a penetração no tecido do hospedeiro e é regulado pelos genes *SAP1* e *SAP3* (COLOMBO et al., 2011; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013; MORAIS-BRAGA et al., 2015). A alteração fenotípica está relacionada com a transição de comensal para patogênico, uma vez que a variação de fases e comutação fenotípica podem

promover evasão do sistema imune e tropismo para determinados tecidos (FRAZER; HERNDAY; BENNET; 2019). Estudos realizados com *C. albicans* mostraram que a forma filamentosa possui estrutura que facilita a adesão e penetração no tecido, no qual as cepas capazes de filamentar apresentaram maior capacidade de invadir o tecido e burlar as defesas do hospedeiro (FELK et al., 2002; ICHIKAWA et al., 2004).

A glucuronoxilomanana (GXM) é um polissacarídeo composto por manose, xilose e ácido glucurônico que está associado à parede celular sendo reconhecido como antígeno ou molécula antigênica em fungos do gênero *Cryptococcus*, compondo a maior parte de sua cápsula (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017). Já se sabe que GXM produzido por espécies de *Trichosporon* apresentam similaridade com a GXM presente em *C. neoformans*. Mesmo não sendo relacionado à produção de cápsula em *Trichosporon* spp., a GXM é um importante componente da superfície celular, sendo relacionada a redução do poder de fagocitose por neutrófilos e macrófagos, facilitando o processo infeccioso (COLOMBO et al., 2011; FONSECA et al., 2019).

Outro fator de virulência estudado é a capacidade de produzir e secretar exoenzimas, facilitando a nutrição celular, degradando vários componentes do tecido do hospedeiro (CORDEIRO et al., 2015; MONTOYA et al., 2015) e regulando a resistência aos antifúngicos como os azólicos e equinocandinas (SILVA et al., 2014). A expressão de enzimas como fosfolipases, hemolisinas, desoxirribonucleases (DNAses) e proteases estão relacionadas com a maior patogenicidade de *Trichosporon* spp. devido à quebra de macromoléculas orgânicas, e interferir na formação das membranas celulares do hospedeiro, facilitando a aderência, colonização e penetração dos tecidos para estabelecer a infecção (COLOMBO et al., 2011; MONTOYA et al., 2015; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

As desoxirribonucleases, também conhecidas como DNAses, são pouco estudadas em fungos do gênero *Trichosporon* (BENTUBO et al., 2014; MARINÉ et al., 2015; MONTOYA et al., 2015). Porém, Silvestre-Junior (2009) relatou forte atividade de DNAses em cepas de *Trichosporon* relacionada com a degradação de oligossacarídeos do hospedeiro. Bentubo et al., (2014), mostram em seus estudos que a temperatura e o tempo de incubação das culturas são fatores reguladores da expressão da atividade da DNase.

As fosfolipases desempenham função de degradar os fosfolipídios da membrana, possibilitando a invasão fúngica na célula do hospedeiro (MARINÉ et al., 2015). Bentubo et al.

(2014) mostraram em seus estudos a produção de fosfolipases em cepas de *Trichosporon*. Já as proteases desempenham papel importante para ultrapassar a barreira imunológica dos hospedeiros, porém há uma lacuna quanto a caracterização da real função dessas enzimas para o processo infeccioso, pois algumas cepas são relatadas produtoras de proteases (CORDEIRO et al., 2015) e outras não possuem essa capacidade (SUN et al., 2012), sugerindo-se que seja uma adaptação das cepas patogênicas aos ambientes em que estejam inseridas, tendo um importante papel na patogenicidade de *Trichosporon* spp., garantindo a penetração no tecido (MURRAY, 2006; BENTUBO et al., 2014).

A melanina é um polímero hidrofóbico multifuncional amplamente distribuído nos ambientes naturais. Possui alto peso molecular e é sintetizado através de reações poliméricas oxidativas a partir de compostos fenólicos, adquirindo uma coloração de marrom escuro a preto (CARVALHO et al, 2014). Outro estudo relatou a produção de melanina em *Trichosporon* spp., na presença de L-DOPA, sendo relacionado à virulência do gênero (CARVALHO et al., 2014). Além disso, a produção de melanina está relacionada a sobrevivência do fungo no ambiente, a proteção contra o sistema imune do hospedeiro, dificultando a fagocitose pelos macrófagos, bem como, na resistência a antifúngicos (BENTUBO et al., 2014). Já se tem vários relatos que a melanina pode ser produzida em várias espécies de fungos como; *Cryptococcus neoformans* (CASADEVALL et al., 2000; BRILHANTE et al., 2017), *Sporothrix schenckii* (MORRIS-JONES et al., 2003), *Histoplasma capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2002) e *Paracoccidioidis brasiliensis* (GÓMEZ et al., 2001).

A expressão dos referidos fatores de virulência é modulada pelo mecanismo de comunicação entre células, chamado de *quorum sensing*, o qual é realizada pela produção de moléculas químicas por cada organismo. Assim, ocorre a regulação da expressão de genes alvos, mecanismos de resistência a antimicrobianos e maturação do biofilme, otimizando a sobrevivência em um ambiente em constante mudança (BANDARA et al., 2012).

2.5 Biofilmes

Durante anos, acreditou-se que os microrganismos cresciam, predominantemente, na forma planctônica. Entretanto, muitos estudos recentes reportam que grande parte dos microrganismos vivem em comunidades, como agregados celulares, chamados de biofilmes

(MONTROYA et al., 2018; OLIVEIRA, CARDOSO, 2018). Os biofilmes são descritos como comunidades microbianas aderidas a uma superfície biótica ou abiótica envolta por uma matriz extracelular polimérica autoproduzida, podem ser formados por uma única espécie (monoespécie) ou um consórcio microbiano (multiespécies) (DI BONAVENTURA et al., 2006; CHIBA et al., 2015; SUGIMOTO et al., 2018). O desenvolvimento do biofilme é um processo cíclico sistemático, começando da adesão inicial de células individuais, seguido de agregação irreversível e maturação e finalmente a dispersão de parte do biofilme maduro para colonizar outra superfície (DAS et al., 2013).

Compondo a complexidade estrutural dos biofilmes, tem-se a matriz extracelular que apresenta funcionalidade química e estrutural aos biofilmes, proporcionando maior proteção às células contra desidratação, perda de nutrientes, como também, regula a penetração de agentes antimicrobianos. (DI BONAVENTURA et al., 2006; ZARNOWSKI et al., 2014; OLIVEIRA, CORDEIRO et al., 2015; CORDEIRO et al., 2021). A matriz extracelular é composta, majoritariamente, de água, proteínas, polissacarídeos e DNA extracelular conferindo integridade estrutural do biofilme e adaptação ao meio circundante, driblando as barreiras imunológicas e se tornando mais resistentes às drogas antimicrobianas (CHIBA et al., 2015; SUGIMOTO et al., 2018).

A cinética de formação do biofilme passa por alguns estágios, são eles: adesão, com interação eletrostática com a superfície e com célula-célula; desenvolvimento, momento em que a matriz extracelular vai sendo produzida pelas próprias células por sinalização mediada por *quorum sensing*; maturação do biofilme com as estruturas organizadas e estabelecidas, os canais de água e distribuição de nutrientes bem formados; e a dispersão, no qual fragmentos do biofilmes são desprendidos para colonizar outras superfícies (Figura 7) (LÓPEZ et al., 2010).

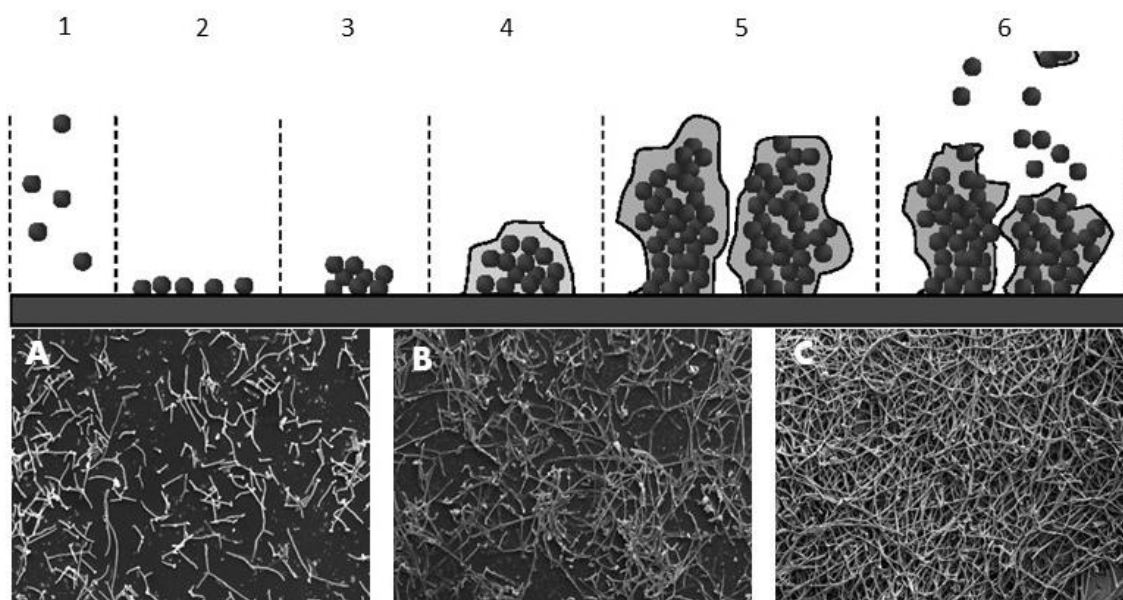


Figura 7: Estágios de desenvolvimento do biofilme. 1. Células planctônicas; 2. Fixação reversível a superfície; 3. formação de microcolônias; 4. adesão irreversível com produção de matriz exopolissacarídica (EPS), e começo da comunicação entre as células mediada por moléculas do *Quorum sensing*; 5. biofilme maduro com estrutura típica de cogumelo e 6. a dispersão de células para colonizar novos locais. Em A, B, e C representa microscopia eletrônica de varredura do processo de adesão, maturação e biofilme maduro, respectivamente, de uma cepa de *T. asahii*. Fonte: Adaptado de TRETER; MACÊDO, 2011; Autoria própria, 2022 (Imagens do MEV).

Estudos relatam fatores que favorecem o processo de adesão celular, sendo influenciada pelo microrganismo, ambiente e tipo de material da superfície. No qual, destaca-se a hidrofobicidade superficial celular, pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura e tempo de exposição como características importantes para a adesão microbiana às superfícies e estabelecimento do biofilme (Figura 8) (TRENTIN et al., 2013; OLIVEIRA; CARDOSO, 2018). Entretanto, durante o processo de desenvolvimento, células fúngicas são constantemente dispersas para o meio externo permitindo a colonização de outras superfícies (TRENTIN et al., 2013; MONTOYA et al., 2018; SUGIMOTO et al., 2018). Em biofilme de *Candida* spp., as células que se desprendem apresentam alta capacidade de adesão a outras superfícies, assim como expressam maior virulência em modelos murino de infecção (UPPULURI et al., 2010).

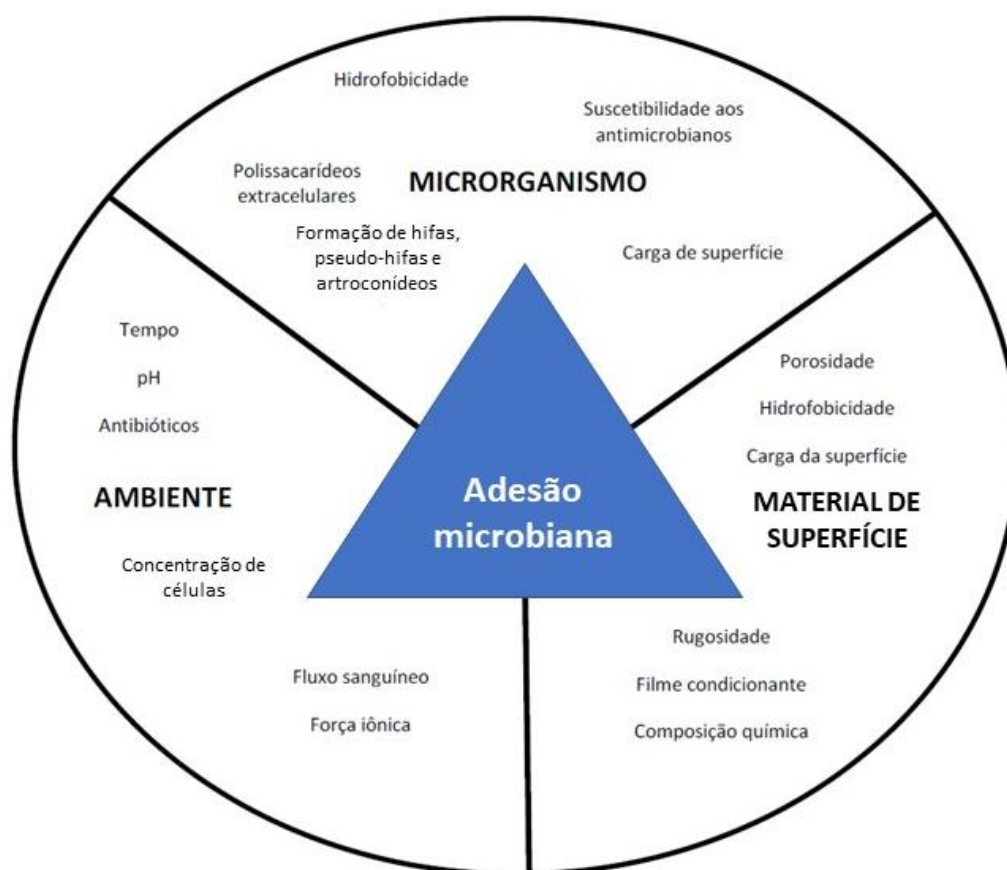


Figura 8: Fatores para o processo de adesão dos microrganismos a superfícies. Tríade de interação dos microrganismos, ambiente e material da superfície. Fonte: Adaptado de TRETER; MACÊDO, 2011.

A formação de biofilmes por fungos tem se destacado nos últimos anos no cenário clínico devido à sua alta capacidade de causar mortalidade em pacientes internados (ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; CONG et al., 2016). Nesse contexto algumas espécies do gênero *Trichosporon* apresentam grande capacidade de formação de biofilmes além de produção de enzimas proteolíticas (CORDEIRO et al., 2015). Estas características estão associadas a uma maior virulência das cepas, de modo que células associadas em biofilme produzem mais proteases que as células planctônicas, além do fenótipo de tolerância aumentada aos antifúngicos quando organizados em biofilmes (CONG et al., 2017; CORDEIRO et al., 2021b). A adesão das células de *Trichosporon* spp. às superfícies pode promover o desvio da atuação das drogas antifúngicas e burlar o sistema imunológico do hospedeiro, causando infecções mais severas e de difícil tratamento (TRENTIN et al., 2013; TAVERNA et al., 2014).

Mesmo já sendo descrita a capacidade de formação de biofilme por espécies de *Trichosporon* e sua relevância clínica, agravando as infecções e dificultando o tratamento, pouco se sabe sobre o processo de formação, desenvolvimento e fisiologia dos biofilmes do

referido gênero (TRENTIN et al., 2013; ITURRIETA-GONZALES et al., 2014; YANG et al., 2016).

Di Bonaventura et al. (2006) foram os primeiros a estudar a cinética de formação e desenvolvimento de biofilme de *T. asahii* em superfície de poliestireno através da microscopia eletrônica, os quais mostraram que as células de *T. asahii* foram capazes de aderir rapidamente à superfície de poliestireno (COLOMBO et al., 2011). Também foi percebido que as espécies de *Trichosporon* capazes de formar biofilmes apresentam uma ampla variedade de estruturas morfológicas, como blastoconídios, artroconídios e produção de hifas inseridas na matriz extracelular compondo a ultraestrutura do biofilme maduro após 48 horas de incubação (ITURRIETA-GONZÁLES et al., 2014; CORDEIRO et al., 2019). Além da matriz ser composta de carboidratos, proteínas, água e ácidos nucleicos durante os seus estágios de desenvolvimento (CORDEIRO et al., 2015). Zarnowski et al. (2014); Karygianni et al., (2020) relatam que o DNA presente na matriz extracelular desempenha um papel estrutural e protetor ao biofilme.

Biofilmes de *T. asahii* têm demonstrado resistência a antifúngicos como anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol (COLOMBO et al., 2011; CORDEIRO et al., 2021). Vários são os fatores relacionados à tolerância dos biofilmes aos antimicrobianos: baixa penetração de agentes químicos, conferido pela barreira física e da interação química da camada de exopolissacarídeos (EPS); crescimento lento de células no interior do biofilme, devido à redução de metabolismo das células encontradas na base do biofilme, visto que os antimicrobianos, geralmente, atuam na fase de crescimento celular, da densidade populacional do aumento da expressão dos genes alvos das drogas e pelo mecanismo da bomba de efluxo (TRENTIN et al., 2013) e a função quelante das drogas promovidas pelo DNA extracelular presente na matriz (MARTINS et al., 2010).

2.6 DNA extracelular em biofilmes

O eDNA foi originalmente descrito como um componente estrutural crítico da matriz dos biofilmes. Porém, há alguns anos, a importância do DNA extracelular (eDNA) tem sido descrita para espécies de *Candida* (MARTINS et al., 2010), como também em diversas espécies de bactérias como exemplo *S. aureus* e *P. aeruginosa* (SUGIMOTO et al., 2018; ALHEDE et al., 2020). O eDNA liberado por bactérias é um fator importante para favorecer a agregação

celular, processo inicial de formação dos biofilmes, agindo como uma cola entre as moléculas que compõem a matriz e entre as próprias células (Figura 9) (WHITCHURCH et al., 2002; BARNES et al., 2012).

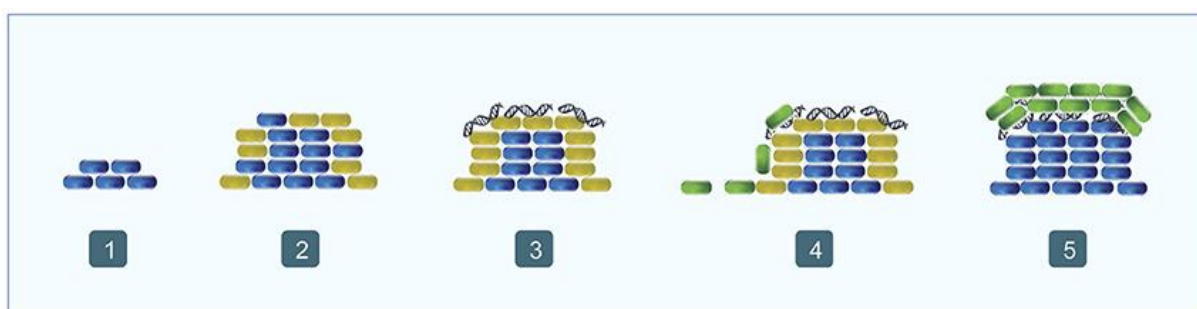


Figura 9: Presença de eDNA nos estágios de adesão (1), maturação (2, 3 e 4) e dispersão (5) de biofilmes microbianos (Adaptado de IBÁÑEZ DE ALDECOA et al., 2017).

O processo de liberação de eDNA para matriz extracelular ainda é pouco conhecido. Entretanto, acredita-se que sejam controladas por sinalizações de moléculas de *quorum sensing*, havendo pelo menos três mecanismos. O primeiro é caracterizado por lise de células de uma mesma cultura, no qual uma subpopulação se sacrifica para liberar DNA. O segundo diz que o DNA é sintetizado e transportado para o meio extracelular através de vesículas. Já o terceiro mecanismo, descrito para bactéria, se caracteriza pela sinalização de prófagos para induzir a morte celular e liberação de eDNA para matriz (Figura 10) (IBÁÑEZ DE ALDECOA et al., 2017).

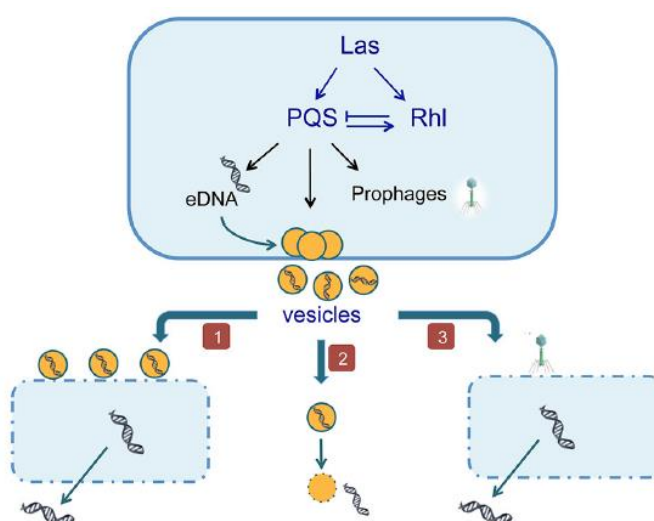


Figura 10: Diferentes mecanismos de liberação de DNA para o meio externo. 1. As células são sinalizadas para sofrer lise e liberar DNA para o meio externo. 2. DNA é sintetizado e transportado para o meio extracelular através

de vesículas. 3. Sinalização de prófagos que induzem as células a sofrerem lise e liberar DNA (IBÁNEZ DE ALDECOA et al., 2017).

Turnbull et al., (2016), da mesma forma, revelaram que há lise celular coordenada, por *quorum sensing*, com consequente liberação de eDNA de uma subpopulação específica de *P. aeruginosa* para compor a integridade estrutural da matriz extracelular (Figura 11). Martins et al., (2011); Pereira et al., 2022, relatam que a liberação de eDNA é liberado com ao longo do desenvolvimento do biofilme até a maturação.

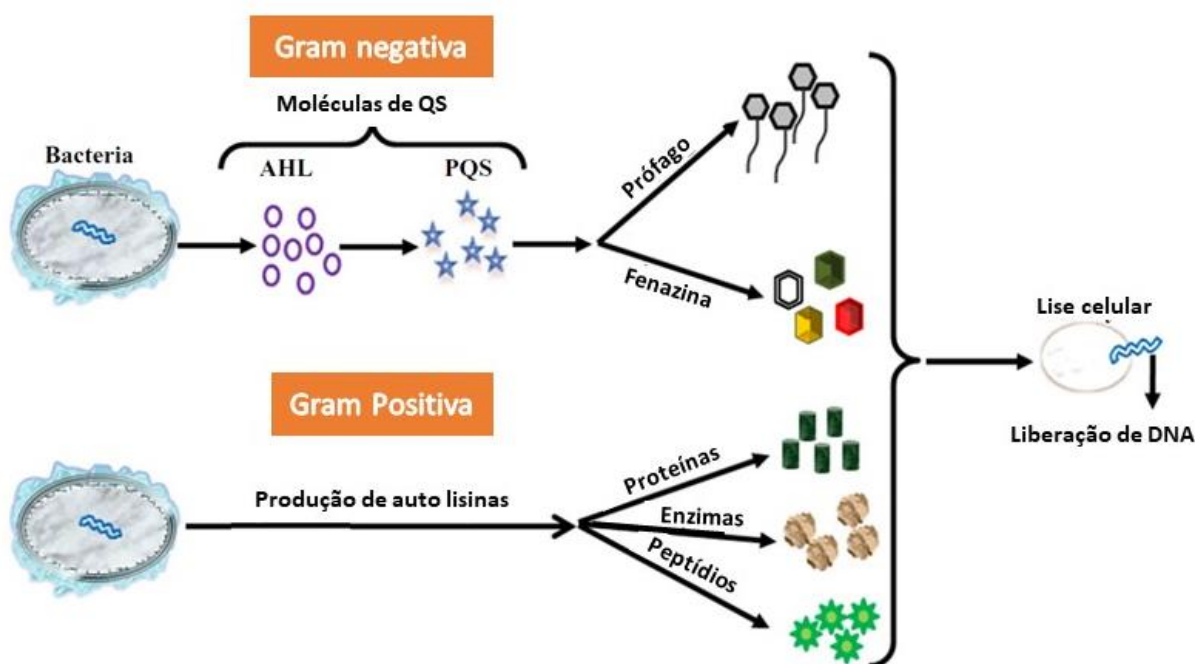


Figura 11: Esquema da liberação de eDNA através de lise celular mediada por profagos, fenazinas e várias autolisinas controladas por mecanismos de *Quórum sensing*. (Adaptado de DAS et al., 2013).

*AHL – Lactonas de homoserina aciladas; PQS – Quinolona de *Pseudomonas*.

É conhecido, que não só o eDNA liberado pelos microrganismos tem contribuição para o papel estrutural e de resistência dos biofilmes. Mas também, as células de defesa do hospedeiro durante o processo de combate à infecção aguda, ocorre apoptose das células polimorfonucleares e liberação de DNA para o meio externo que juntamente com o DNA microbiano, confere maior robustez ao biofilme com consequente agravamento do processo infeccioso (ALHEDE et al., 2020).

A importância do eDNA para os biofilmes também foi comprovada quando se tratou biofilmes com enzima DNase, no qual cliva a fita dupla do DNA, rompendo as ligações fosfodiéster. Isso faz com que a matriz enfraqueça e, mesmo não dispersando o biofilme, aumenta a sensibilidade, inibindo fortemente a adesão celular e robustez do biofilme formado (Figura 12) (MARTINS et al., 2011; OKSHEVSKY et al., 2015; KARYGIANNI et al., 2020).

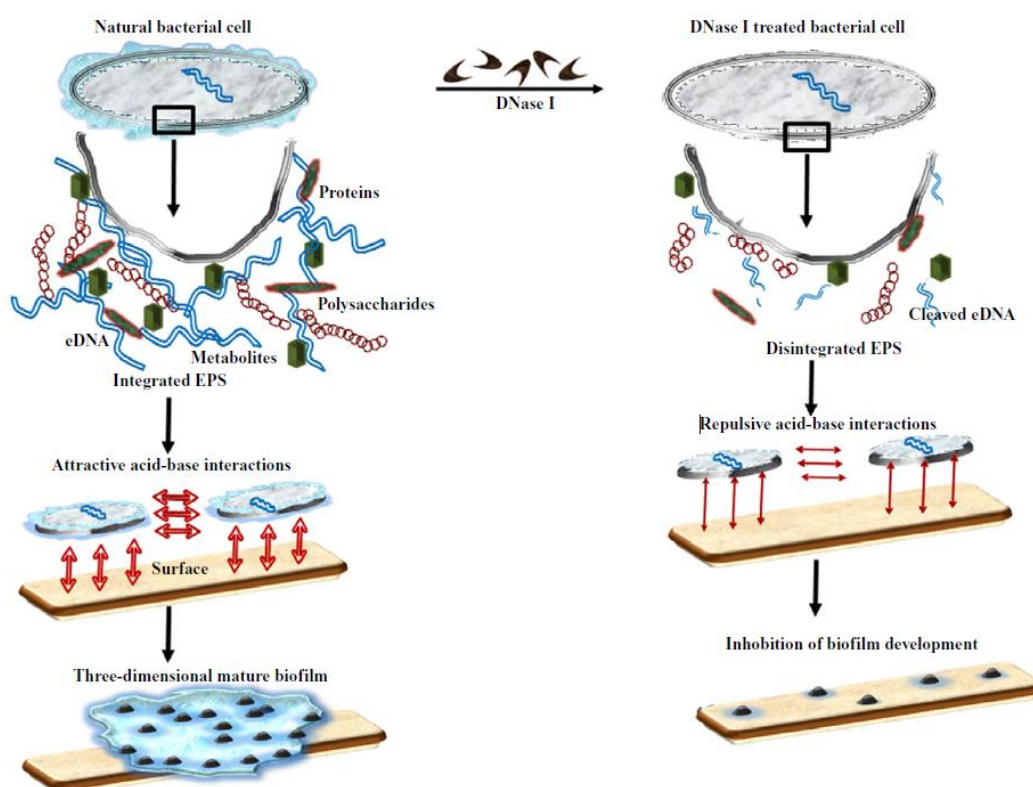


Figura 12: Papel da enzima DNase sobre a estrutura dos biofilmes.

Para fungos, estudos mostram o mesmo padrão de importância, o eDNA compondo a biomassa dos biofilmes maduros, e quando adicionado eDNA de origem exógena se observa o aumento substancial da biomassa em biofilmes de *Candida* spp. (MARTINS et al., 2011; SUGIMOTO et al., 2018) e recentemente, em biofilmes de *Trichosporon* (PEREIRA et al., 2022).

Assim, diante do aumento de isolados de *Trichosporon* spp. em infecções invasivas, especialmente as infecções do trato urinário. Assim como, a gravidade dessas infecções quando

relacionadas a formação de biofilmes em dispositivos médicos invasivos, como sonda de demora e cateteres urinários, dificultando o tratamento com desfecho clínico desfavorável. Este estudo se justifica pela necessidade de analisar e caracterizar o perfil de crescimento dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* suplementado com eDNA. Adicionalmente, a investigação da capacidade de desenvolver biofilmes em meio simulador de urina, mesmo com escassez de nutrientes.

3 PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Fungos *T. asahii* e *T. inkin* são capazes de liberar eDNA para matriz extracelular dos biofilmes em diferentes estágios de desenvolvimento?
2. A adição de eDNA em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* em diferentes estágios de desenvolvimento altera a biomassa e o padrão de sensibilidade dos biofilmes às drogas antifúngicas?
3. Ao tratar os biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* com a enzima DNase, desestabiliza a robustez dos biofilmes, diminui a viabilidade celular e altera o padrão de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B e voriconazol?
4. Meio Simulador de Urina (MSU) é um meio favorável para crescimento planctônico, formação e desenvolvimento de biofilmes de cepas de *T. asahii* e *T. inkin*?
5. A adição de eDNA aos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* formados em MSU altera a biomassa e o padrão de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B e Voriconazol?

4 HIPÓTESES

1. Há crescente liberação de DNA ao longo do processo de formação e maturação dos biofilmes de espécies de *T. asahii* e *T. inkin*.
2. A adição de DNA favorece o processo de formação e maturação do biofilme de *Trichosporon*, altera a morfologia e aumenta a tolerância aos antifúngicos AMB e VRZ.
3. O tratamento com a enzima DNase diminui a biomassa, a viabilidade, altera a morfologia e o padrão de sensibilidade a AMB e VRZ dos biofilmes formados por *T. asahii* e *T. inkin*.
4. Cepas de *T. asahii* e *T. inkin* se desenvolvem em MSU e são capazes de formar biofilmes.
5. A adição de eDNA nos biofilmes formados de *T. asahii* e *T. inkin* no MSU aumenta a biomassa e diminui sensibilidade aos antifúngicos AMB e VRZ.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar a liberação de DNA nas etapas de desenvolvimento de *T. asahii* e *T. inkin*, e como a adição de DNA extracelular e DNAse interferem na biomassa, metabolismo e tolerância dos mesmos biofilmes. Além disso, analisar o crescimento planctônico e desenvolvimento dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* em meio simulador de urina quanto ao metabolismo, biomassa e padrão de tolerância aos antifúngicos com e sem adição de eDNA.

5.2 Objetivos Específicos

1. Quantificar a liberação de eDNA no sobrenadante e na matriz extracelular de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* nas etapas de adesão, formação e biofilme maduro.
2. Determinar o impacto da adição de DNA exógeno na biomassa, viabilidade celular, morfologia e sensibilidade dos biofilmes de *Trichosporon*.
3. Verificar a ação da enzima DNAse isoladamente e em combinação com os antifúngicos AMB e VRZ sobre a biomassa, viabilidade celular, morfologia e sensibilidade dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.
4. Analisar o crescimento planctônico e a formação de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* nas etapas de adesão, formação e biofilme maduro em MSU.
5. Determinar a influência da adição de eDNA nos biofilmes formados de *T. asahii* e *T. inkin* formados em meio simulador de urina e o padrão de sensibilidade aos antifúngicos AMB e VRZ.

6 METODOLOGIA

6.1 Desenho experimental

Este trabalho foi organizado em duas etapas. A primeira parte foi constituída pela caracterização do perfil de liberação de DNA nas etapas de adesão, formação e biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, bem como a influência do DNA exógeno na biomassa, viabilidade celular, perfil de sensibilidade à AMB e VRZ e ultraestrutura morfológica. Também foi avaliado o efeito da enzima DNase sozinha e em combinação com os antifúngicos sobre a biomassa, viabilidade celular e sensibilidade dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.

A segunda parte experimental focou na investigação da capacidade de desenvolvimento celular e formação de biofilme de *T. asahii* e *T. inkin* em Meio Simulador de Urina (MSU), assim como o impacto da adição de eDNA na biomassa, viabilidade celular, sensibilidade à AMB e VRZ e ultraestrutura morfológica em biofilmes formados em MSU. As etapas experimentais foram conduzidas conforme apresentado na figura 13.

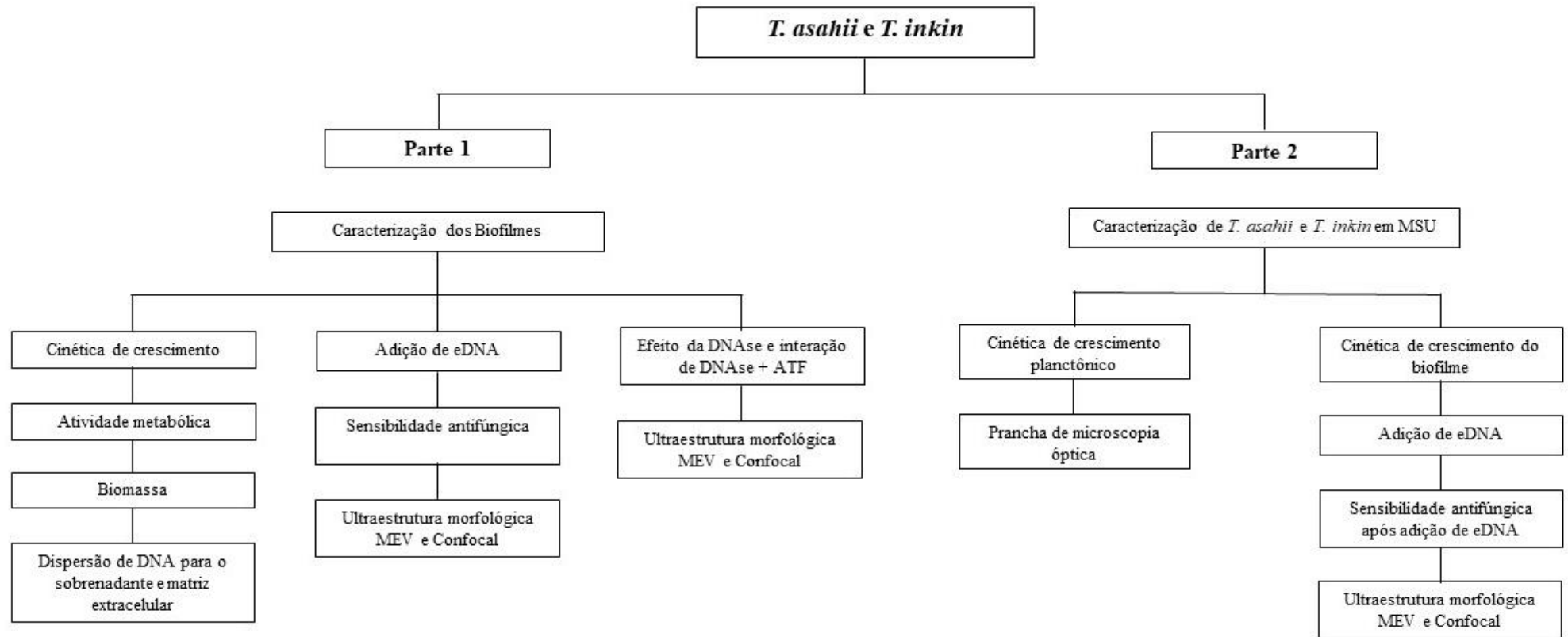


Figura 13: Organograma e estruturação experimental deste estudo.

* DNA (ácido desoxirribonucléico); eDNA (DNA extracelular); MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura); DNase (Enzima que quebra moléculas de DNA); ATF (Antifúngico); MSU (Meio Simulador de Urina).

6.2 Local de estudo

Este estudo foi desenvolvido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) e no Laboratório de Bioagentes Infeciosos, pertencentes ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce. A análise topográfica dos biofilmes por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada na Central Analítica, Departamento de Física da UFC. A análise no equipamento Cytation foi realizada no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC.

6.3 Microrganismos

Foram avaliados isolados clínicos de *Trichosporon asahii* CEMM 05-6-072 (n = 1, GenBank JX124945) e *T. inkin* CEMM 05-6-74 (n = 1, GenBank JX124953) originados de infecções do trato urinário. As cepas estão depositadas na micoteca do CEMM da Universidade Federal do Ceará, Brasil. A identificação das cepas foi baseada na análise micromorfologia em ágar Malte (HIMEDIA, Brasil) (CARVALHO et al., 2008), e por sequenciamento da região IGS do DNAr (CORDEIRO et al., 2015, RODRIGUEZ-TUDELA, 2005).

Os microrganismos foram recuperados em ágar Batata (KASVI, ES) cultivados por 48 h a 35°C. A pureza e identificação das cepas foi confirmada por testes fisiológicos como hidrólise de ureia, assimilação de carboidratos e caracterização morfológica em ágar Malte (HIMEDIA, BR), com presença de artroconídios, blastoconídios, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (HOOG, 2000; BENTUBO et al 2013).

6.4 Drogas antifúngicas

Foram testadas drogas antifúngicas: anfotericina B (AMB – Sigma-Aldrich, EUA) e voriconazol (VRZ, Sigma-Aldrich, EUA). Anfoterina B e Voriconazol foram diluídos em DMSO 100% para solução estoque conforme documento M27 – A3 do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). A solução de trabalho foi diluída nos meios RPMI 1640 e em meio simulador de urina (MSU) no momento de uso (CORDEIRO et al. 2019). As drogas foram utilizadas nas concentrações de AMB 64 µg/mL para *T. asahii* e 8 µg/mL para *T. inkin* e VRZ na concentração de 64 µg/mL para ambas as cepas (CORDEIRO et al. 2015).

6.5 DNA extracelular

O DNA extracelular de baixo peso molecular de esperma de salmão (Sigma-Aldrich, EUA) foi diluído em água ultrapura estéril (de acordo com as instruções do fabricante) na concentração inicial de 1 mg/L, posteriormente, diluída na concentração de 12,8 µg/mL, concentração 10 vezes maior que a concentração inicial usada nos testes. Em seguida, as soluções de trabalho foram diluídas nos meios RPMI e MSU nas concentrações de 1280, 640, 320, 160 e 80 ng/mL (MARTINS et al., 2010).

1ª PARTE EXPERIMENTAL

6.6 Caracterização dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

Para análise do desenvolvimento dos biofilmes, os isolados foram previamente cultivados em ágar batata por 48 h a 35°C. Os biofilmes foram formados segundo a metodologia descrita por Cordeiro et al. (2015), em microplaca de poliestireno de 96 poços com inóculo ajustado na concentração de 10⁶ células/ mL em meio RPMI 1640 tamponado com Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS) em pH 7,0 e incubadas a 35 °C sob agitação de 80 rpm. Após 6 h de incubação (tempo de adesão celular), o sobrenadante foi retirado para remoção das células não aderidas, os poços foram lavados com PBS 1x estéril e novamente preenchidos com RPMI 1640. As placas foram novamente incubadas até o tempo estipulado de análise. Os biofilmes foram avaliados quanto a biomassa, atividade metabólica, viabilidade celular e liberação de ácidos nucleicos nos intervalos de tempo de 6, 24 e 48 h de incubação.

6.6.1 Biomassa

A biomassa dos biofilmes foi avaliada pela técnica de coloração por cristal violeta (PEETERS et al., 2008). Após cada um dos intervalos de cultivo, o sobrenadante foi removido e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS-*Tween*20 estéril, em seguida foram desidratados e fixados com 200 µL de metanol (Dinâmica, Brasil) por aproximadamente 5 min, o volume foi removido e deixado secar para evaporação total do metanol. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas de 200 µL de cristal violeta a 0,3% e deixado por 20 min em temperatura ambiente. O corante foi removido e os poços contendo biofilme foram delicadamente lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante. Após as lavagens dos poços, o corante

impregnado no biofilme foi removido pela adição de 200 μ L de ácido acético a 33% (v/v) durante 30 segundos. O sobrenadante foi removido e transferido para novas placas de fundo chato com 96 poços e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm (PEETERS et al., 2008). Todo o experimento foi realizado em duplicata.

6.6.2 Atividade metabólica

A análise metabólica dos biofilmes, nos diferentes tempos de cultivo, foi realizada com o ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]2H-hidroxido de tetrazólio (XTT) (Sigma-Aldrich, EUA), adaptado de Martinez e Casadevall (2006). Após os tempos de cultivo, os poços contendo biofilmes foram lavados com PBS para remoção de células não aderidas e em seguida, os poços foram preenchidos com 50 μ L de PBS estéril, 75 μ L da solução de XTT estéril (1 mg/mL em PBS – Sigma, EUA) e 6 μ L de menadiona (1 mM em acetona – Sigma, EUA), somando um total de 131 μ L em cada poço. Todo o processo foi realizado sobre proteção da luz direta. As placas foram incubadas por 3 h a 35 °C ao abrigo da luz. Decorridas as 3 h a solução de XTT foi transferida para outra placa de fundo chato com 96 poços e lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm. A atividade metabólica dos biofilmes foi medida pela mudança colorimétrica da atividade das desidrogenases mitocondriais, que reduzem XTT a formazan assumindo coloração alaranjada, quanto mais laranja mais intensa a atividade metabólica (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

6.6.3 Viabilidade celular

Após os períodos de incubação dos biofilmes em placas de 96 poços a 35 °C, o sobrenadante foi removido, desprezados e os poços foram repreenchidos com 200 μ L de PBS estéril. Os biofilmes foram raspados com o auxílio de uma ponteira estéril e ressuspensos e homogeneizados em PBS. Foram feitas diluições seriadas em NaCl (0,9%) estéril na proporção de 1:10 até a diluição de 10^{-3} . Posteriormente, alíquotas de 100 μ L foram semeadas, por espalhamento, em placas de ágar Batata em duplicata. As placas foram incubadas por 48 h a 35 °C para crescimento celular, em seguida as colônias foram contadas. O teste foi feito em duplicata em dois experimentos distintos (CORDEIRO et al., 2015).

6.6.4 Quantificação de ácidos nucléicos

A quantificação de ácidos nucléicos foi feita em dois momentos, tanto do DNA presente no sobrenadante quanto do DNA preso na matriz extracelular dos biofilmes. Para tanto, a cada um dos tempos analisados, os sobrenadantes dos biofilmes foram coletados e centrifugados para separação das células suspensas do meio de cultivo.

Os poços contendo biofilmes foram lavados, preenchidos com 200 μ L de PBS, raspados vigorosamente com o auxílio de uma ponteira. A massa obtida foi sonicada a uma potência de 10% por 1 min e agitada em vórtex por 1 min. Posteriormente, foram filtrados com membrana de 0,22 μ m para retenção de células. O DNA do sobrenadante e da matriz extracelular foram quantificados utilizando o kit de quantificação de DNA Quant-iT BR da Invitrogen com o equipamento Qubit (Life Technologies) (CORDEIRO et al., 2015).

6.7 Efeito do eDNA nos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

6.7.1 Adição de eDNA nos biofilmes

Os biofilmes foram formados conforme descrito anteriormente e nos tempos de 0, 6, 24 e 30 h de incubação, eDNA (DNA de esperma de salmão de baixo peso molecular; Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado em diferentes concentrações (1280, 640, 320, 160 e 80 ng/mL) (Martins et al., 2010). Os biofilmes foram então incubados até completar 48 h a 35 ° C sob agitação de 80 rpm. Em seguida, os poços foram lavados com PBS-*Tween*20 para remover as células não aderidas no poço e a biomassa foi quantificada pela coloração de cristal violeta e lida no espectrofotômetro a 540 nm (Peeters et al., 2008), conforme descrito anteriormente. Biofilmes sem eDNA foram usados como controles. Os experimentos foram conduzidos em triplicata em dois testes independentes.

6.7.2 Efeito do eDNA e DNase na sensibilidade do biofilme a antifúngicos

Biofilmes foram formados com adição de eDNA (160 ng/mL) em diferentes intervalos de tempo (0, 6, 24, e 30 h) deixados completar 48 h de cultivo e avaliados quanto á tolerância aos antifúngicos AMB e VRZ (MARTINS et al., 2010).

O efeito da DNase foi avaliado em biofilmes de 24 h e 30 h de cultivo, período de formação dos biofilmes. As células sésseis foram tratadas com a enzima DNase de pâncreas

bovino (Sigma, EUA) em diferentes concentrações (2, 1, 0,5, 0,25 mg/mL) e incubadas por mais até completar as 48 h (MARTINS et al. 2011).

Os sobrenadantes dos biofilmes de 48 h previamente expostos ao eDNA ou DNase foram aspirados e as células sésseis foram desafiadas com anfotericina B (AMB; Sigma-Aldrich a, EUA) a 64 µg/mL para *T. asahii* e 8 µg/mL para *T. inkin*; voriconazol (VRZ; Sigma-Aldrich, EUA) foi testado a 64 µg/mL para ambas as espécies (CORDEIRO et al. 2015). Os biofilmes foram incubados por mais 48 horas a 35°C sob agitação de 80 rpm, para ação do antifúngico, e então analisados quanto a biomassa (PEETERS et al. 2008). Os experimentos foram realizados em triplicata em dois testes independentes.

6.8 Morfologia e ultraestrutura dos biofilmes

6.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), os biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 foram formados em lâmina de Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, EUA) em placas de 24 poços e nos tempos de 24 e 30 h, foi adicionado eDNA na concentração de 160 ng/mL, visto que foi a concentração que houve maior influência na biomassa dos biofilmes. Os biofilmes foram deixados até completar 48 h de cultivo, e comparados com os respectivos controles livre de eDNA (MARTINS et al., 2010).

Os biofilmes foram fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5 % com tampão cacodilato de sódio 0,15 M e um corante catiônico azul de alcian 0,01 % e incubados a 4°C *overnight*. Os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato de sódio 0,15 M e desidratados com lavagens seriadas de álcool nas concentrações 50 %, 70 %, 80 %, 95 % e 100 %, por 10 minutos, duas vezes cada. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com hexametildisilazano (Polysciences, UE) por 30 minutos (CORDEIRO et al., 2019). Para realização da técnica de microscopia, as lâminas foram recobertas com ouro pela máquina metalizadora Emitech Q150T. As superfícies foram examinadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV) (FEI Inspect S50) em alto vácuo a 15KV. As imagens capturadas foram processadas em *software Photoscape*, v.3.6.5 (MooiTech, Korea) (CORDEIRO et al., 2015).

6.8.2 Microscopia Confocal a Laser

A ação do eDNA e da enzima DNase (sigma-Aldrich, EUA) sobre a ultraestrutura e viabilidade dos biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074, foram avaliadas pela microscopia confocal, de acordo com Di Bonaventura et al., (2006). Os biofilmes foram formados, conforme descrito anteriormente (6.8.1), em lâmina de Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, NY) em placas de 24 poços. Com 24 e 30 h de cultivo, foi adicionado eDNA na concentração de 160 ng/mL e em paralelo foi adicionado DNase após 24 h de cultivo nas concentrações 2, 1, 0,5, 0,25 mg/mL e incubados por mais 24 h para maturação do biofilme (MARTINS et al., 2011). Os tratamentos foram comparados com o controle livre de eDNA e DNase.

As lâminas de thermanox foram cobertas com 200 µL do corante de fluorescência *Live/Dead*™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, NY). Após 30 min, as lâminas foram então avaliadas em Microscópio Confocal Nikon C2, com comprimento de onda de 488 nm para detecção do corante SYTO9, que identifica células viáveis em verde, e a 561 nm para detecção do iodeto de propídio, que indica células não viáveis. Para análise das imagens, foram escolhidos 7 campos, aleatórios, das imagens tridimensionais e a quantificação colorimétrica, bem como a mensuração do *Z-slice* foram realizadas usando software *ImageJ* 1.50i (COLLINS, 2007).

6.9 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o teste t de Student ou análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc de Tukey*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad Prism 7.0* (GraphPad Software, CA, EUA).

2ª PARTE EXPERIMENTAL

7. Material e Método

7.1 Microrganismos

As cepas testadas de *T. asahii* (CEMM 05-6-072, *GenBank* JX124945) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074, *GenBank* JX124953) foram isolados de infecções do trato urinário. As cepas estão depositadas na coleção do CEMM, da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

A identificação foi feita pela análise da macro e micromorfologia em ágar malte (DE HOOG et al., 2000) e pelo sequenciamento da região IGS do rDNA (RODRIGUEZ-TUDELA, 2005; GUO et al., 2019).

7.2 Meios de cultivo

Para os ensaios da segunda parte do trabalho foram utilizados dois meios de cultivo, o convencional RPMI 1640 (Sigma, EUA) pH 7, tamponado com 0,165 M de tampão MPOS (ácido morfolinopropanosulfônico – Sigma-Aldrich, EUA) e o meio simulador de urina (MSU) com pH 6,5 suplementado com 0,2% de glicose (BROOKS; KEEVIL, 1997), prepara do com os reagentes descritos na tabela 1.

Tabela 1: Componentes do meio simulador de urina

Componente	MSU (g/L)	RPMI 1640 (g/L)
Glicose	2	2
Peptona bovina	1	-
NaCl	5,2	6,0
VITAMINAS	-	*
AMINOÁCIDOS	-	**
Extrato de Levedura	0,005	-
Sulfato de Magnésio	0,49	0,049
Ureia	10	-
Ácido Lático	0,1	-
Ácido Cítrico	0,4	-
Bicarbonato de Sódio	2,1	-
Ácido Úrico	0,07	-
Creatinina	0,8	-
Cloreto de Cálcio	0,37	-
Sulfato de Ferro II	0,0012	-
Sulfato de sódio	3,2	-
Potassium Dihydrogen Phosphate	0,95	-
Di-potassium Hydrogen Phosphate	1,2	-
Ammonium Chloride	1,3	-
Nitrato de Cálcio	-	0,1
Cloreto de Potássio	-	0,4
Fosfato de sódio	-	0,8
Vermelho de Fenol	-	0,0053

* Biotina 0,0002; D-pantotênico 0,00025; Riboflavina 0,002; Ácido fólico 0,001; PABA 0,001; Piridoxina HCl 0,001; Niacinamida 0,001; Cloreto de colina 0,003; Mio-inositol 0,035; Tiamina HCl 0,001; Vitamina B12 0,000005.

**L-isoleucina 0,050; L-leucina 0,050; L-asparagina 0,05; L-arginina 0,2; Ácido L-glutâmico: 0,02; L-arginina 0,2; Ácido L-aspártico 0,02; L-cistina 0,0652; L-glutamina 0,3; Glicina 0,01; L-histidina 0,015; L-hidroxiprolina 0,020; L-lisina 0,04; L-metionina 0,015; L-fenilalanina 0,015; L-prolina 0,02; L-serina 0,03; L-treonina 0,02; L-triptofano 0,005; L-tirosina 0,029; L-valina 0,02; Glutaciona 0,001.

7.3 Preparação dos antifúngicos e eDNA

Os antifúngicos Anfotericina B (AMB, Sigma-Aldrich, EUA) e Voriconazol (VRZ, Sigma-Aldrich, EUA) foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% para solução

estoque (CLSI M27 A3, 2008). A solução de trabalho foi ajustada no meio MSU e no meio RPMI 1640, no momento de uso. As drogas foram utilizadas nas concentrações de AMB 64 µg/mL para *T. asahii* e 8 µg/mL para *T. inkin*; Voriconazol na concentração 64 µg/mL para ambas as cepas (CORDEIRO et al., 2015).

O DNA extracelular (DNA de esperma de salmão de baixo peso molecular; Sigma, EUA) foi diluído em água ultrapura estéril com solução estoque de 12,8 µg/mL, posteriormente, a solução de trabalho foi preparada nos meios MSU e RPMI na concentração de 160 ng/mL (MARTINS et al., 2010; PEREIRA et al., 2022).

7.4 Cinética de crescimento planctônico

Os isolados de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 foram previamente semeados em ágar batata e incubados a 35°C por 48 h. A partir dessas colônias, células foram ressuspensas em meio RPMI e MSU estéril até atingirem a escala de 0,5 McFarland (CORDEIRO et al., 2015). O cultivo foi feito em placa de 96 poços de fundo redondo, incubados a 35°C e nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h, o cultivo foi interrompido, retirado uma alíquota de 50 µL, colocado em lâmina de vidro para visualização ao microscópio óptico com aumento de 400x, magnitude 100 µm, após serem coradas com técnica de Gram.

7.5 Biomassa e viabilidade celular de biofilme de *T. asahii* e *T. inkin* em MSU e RPMI

Os biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 foram formados em MSU e RPMI em placas de 96 poços de fundo chato com concentração de células de 1×10^6 cél/mL e incubados a 35°C sob agitação de 80 rpm (CORDEIRO et al., 2015). Após 6 h de adesão foi removido o sobrenadante para retirar células não aderidas e incubadas novamente com os respectivos meios de cultivo. Nos momentos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de desenvolvimento os biofilmes foram avaliados quanto a biomassa e a viabilidade celular (PEREIRA et al., 2019).

A análise de biomassa foi feita pela coloração de cristal violeta. Para tanto, após cada período supracitado, os biofilmes foram interrompidos e os poços contendo biofilme foi removido o sobrenadante, lavado com PBS para remoção das células não aderidas e fixados com 200 µL de metanol por 5 min. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de cristal violeta 0,33 % em cada poço e deixados agir por 20 min. O corante foi ressuspendido em 200 µL de

ácido acético, transferidos para uma outra placa de fundo chato e levado ao espectrofotômetro para leitura de absorvância em um comprimento de onda de 540 nm (PEETERS et al., 2008).

A viabilidade celular foi analisada pela quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC). Para isso, após cada período os biofilmes foram raspados vigorosamente com o auxílio de uma ponteira e a suspensão de células foi diluída de 1:1000 em solução salina estéril. Em seguida, 100 µL foram distribuídos em placas de Petri de ágar batata, incubado por 48 h a 35 °C para contagem de unidade formadoras de colônias (CORDEIRO et al., 2021).

Os biofilmes cultivados em MSU foram comparados com aqueles mostrados em meio RPMI em cada intervalo de tempo. Os experimentos foram feitos em triplicata em dois testes independentes.

7.6 Efeito do eDNA na biomassa dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* formados em MSU e RPMI

Para avaliar o efeito da adição de eDNA, os biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 foram formados como descrito acima em MSU e RPMI em placa de 96 poços de fundo chato e nos períodos de 24, 48 e 72 h foi adicionado eDNA na concentração de 160 ng/mL diluídos nos meios de cultivo MSU e RPMI (PEREIRA et al., 2022). Os biofilmes foram incubados até completarem 96 h. As placas foram incubadas vedadas para evitar a evaporação.

Após 96 h o sobrenadante foi removido, os poços lavados para retirar células não aderidas e feito a quantificação da biomassa do biofilme pela coloração de cristal violeta com leitura no comprimento de onda de 540 nm (Peeters et al., 2008). Biofilmes sem eDNA foram usados como controle nos referidos meios de cultivo. O experimento foi conduzido em triplicata em dois testes independentes.

7.7 Sensibilidade antifúngica após adição de eDNA

Os biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 cultivados em MSU e RPMI foram desafiados com AMB e VRZ previamente expostos ao eDNA. Para tanto, foi adicionado eDNA na concentração de 160 ng/mL nos tempos de 24, 48 e 72 h e deixados até a maturação dom 96 h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionado 200 µL de AMB na concentração de 64 µg/mL para *T. asahii* e 8 µg/mL para *T. inkin* e VRZ na

concentração de 64 µg/mL para ambas as cepas e deixados incubados por mais 48 h. As diluições foram feitas nos respectivos meios de cultivo. Biofilmes sem eDNA foram usados como comparativo de ação das drogas. Após esse período foi feita a coloração de cristal violeta com leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os testes foram conduzidos em triplicada em dois momentos distintos.

7.8 Morfologia e ultraestrutura de biofilme de *T. asahii* e *T. inkin* em MSU e RPMI

7.8.1 Microscopia eletrônica de varredura e Microscopia confocal a laser

Para caracterização da ultraestrutura por MEV e Confocal, os biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 foram formados em lâminas de Thermanox™ (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) em MSU e em RPMI com 10⁶ cél/mL a 35 °C e cultivados por 72 h. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e adicionado eDNA na concentração de 160 ng/mL agindo até as 96 h. Para comparativo de crescimento, foi cultivado biofilmes sem adição de eDNA (PEREIRA et al., 2022).

Os biofilmes foram fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,15 M e 0,1% de azul de alcian, incubados a 4°C *overnight*. Os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato de sódio 0,15 M e desidratados com lavagens seriadas de álcool nas concentrações 50 %, 70 %, 80 %, 95 % e 100 %, por 10 minutos, duas vezes cada. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com hexametildisilazano (HMDS) (Sigma, EUA) por 30 minutos (CORDEIRO et al., 2019). Para realização da técnica de microscopia, as lâminas foram recobertas com ouro pela máquina metalizadora Emitech Q150T. As superfícies foram examinadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV) (FEI Inspect S50) em alto vácuo a 15KV. As imagens capturadas foram processadas em *software Photoscape*, v.3.6.5 (MooiTech, Korea) (CORDEIRO et al., 2019).

A microscopia confocal para análise de viabilidade, biovolume e espessura, foi feito de acordo com a metodologia de Di Bonaventura et al., (2006). As lâminas de thermanox foram cobertas com 200 µL do corante de fluorescência *Live/Dead*™ (Invitrogen, MA). Após 30 min, as lâminas foram então avaliadas em Microscópio Confocal Nikon C2, com comprimento de onda de 488 nm para detecção do corante SYTO9, que identifica células viáveis em verde, e a 561 nm para detecção do iodeto de propídio, que indica células não viáveis. Para análise das imagens, foram escolhidos 7 campos das imagens tridimensionais e a quantificação

colorimétrica, bem como a mensuração do *Z-slice* foram realizadas usando *software ImageJ* 1.50i (COLLINS, 2007).

7.9 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o teste t de Student ou análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido pelo teste post-hoc de Tukey e Sidak. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, EUA).

8 RESULTADOS

1ª PARTE EXPERIMENTAL

Os resultados abaixo foram publicados na revista *Biofouling* com fator de impacto 3.797 e Qualis A1; DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2130788>, 2022.

Heterologous extracellular DNA facilitates the development of *Trichosporon asahii* and *T. inkin* biofilms and enhances their tolerance to antifungals.

8.1 Cinética de liberação de eDNA durante a desenvolvimento dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

O eDNA foi liberado para o meio extracelular em vários estágios de desenvolvimento dos biofilmes, encontrando-se tanto no sobrenadante quanto na matriz extracelular MEC (Figura 14). A concentração de eDNA endógeno no sobrenadante aumentou ao longo do tempo nos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, porém o conteúdo de eDNA na MEC de ambas as espécies permaneceu constante.

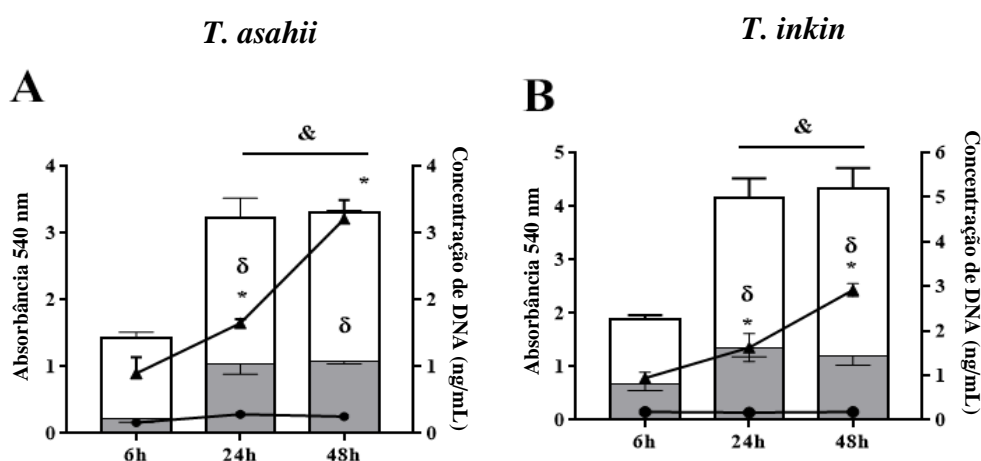


Figura 14: Atividade metabólica (barras cinzas), biomassa (barras brancas) e concentração de DNA na matriz extracelular (●) e sobrenadante (▲) dos biofilmes de *T. asahii* (A) e *T. inkin* (B). As medições foram feitas em 6 h, 24 h e 48 h de biofilmes formados em meio RPMI a 35°C. Diferenças estatisticamente significativas de atividade metabólica (δ), biomassa (&) e DNA sobrenadante (*) quando comparados aos biofilmes de 6 h ($p < 0,05$).

8.2 Efeito da adição de eDNA exógeno no desenvolvimento de biofilmes de *Trichosporon*

O eDNA exógeno nas concentrações de 1280, 640, 320, 160 e 80 ng/mL aumentou a biomassa de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* em todos os estágios de desenvolvimento, chegando a um incremento de até 50% na biomassa para ambas as espécies quando adicionado eDNA desde o início do processo de adesão celular, conforme observado na Figura 15.

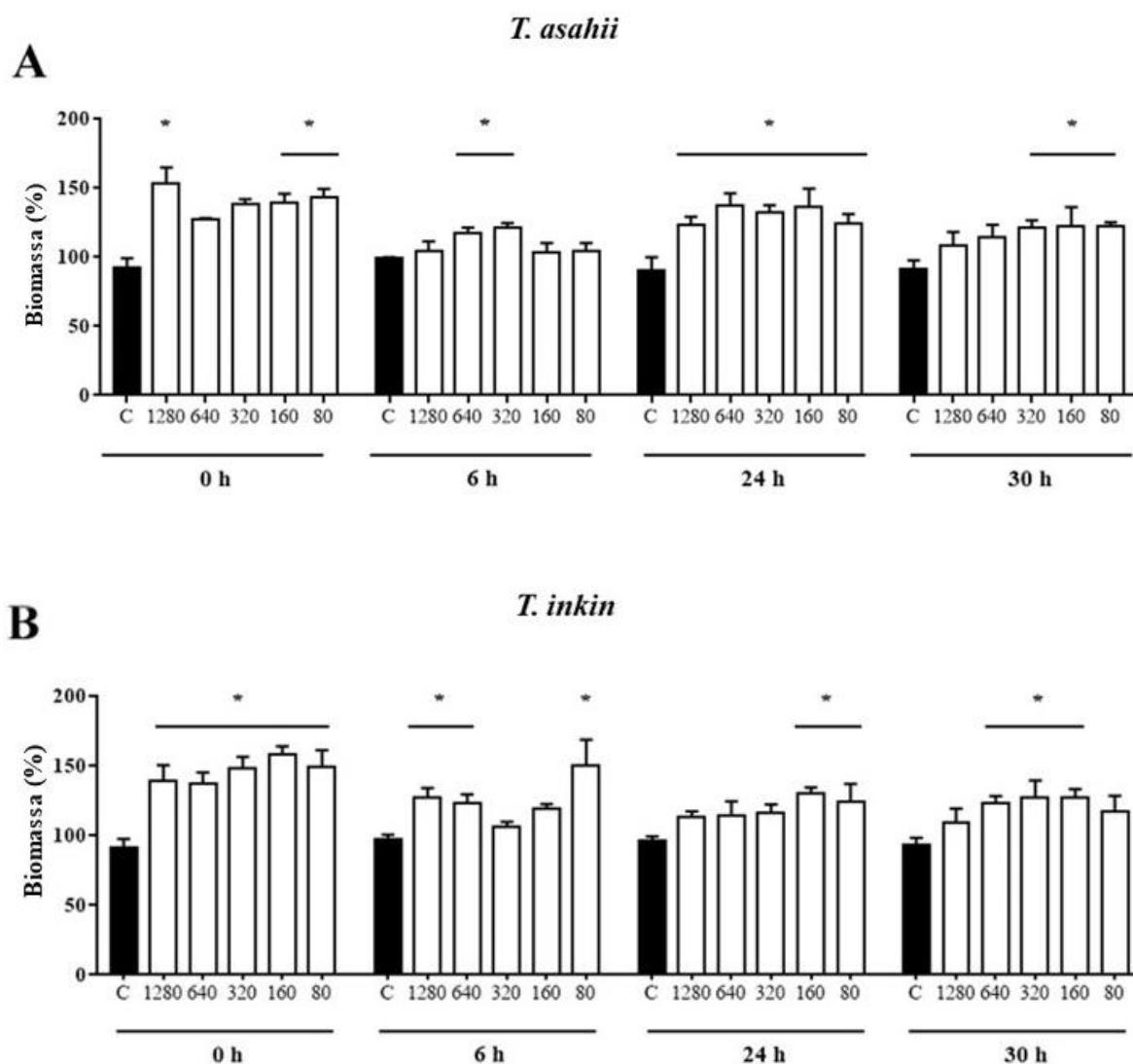
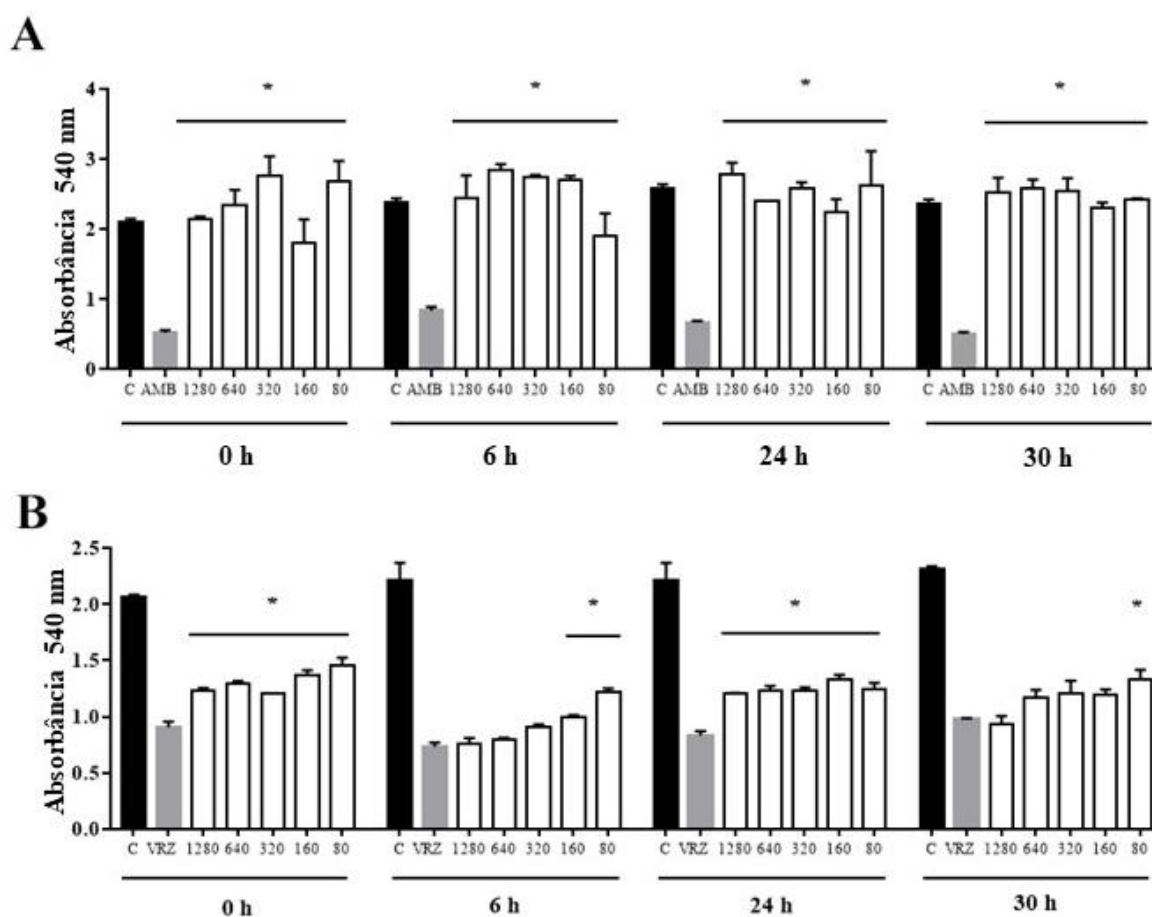


Figura 15: Efeito do eDNA exógeno na biomassa de *T. asahii* (A) e *T. inkin* (B) em biofilmes de 48 h. eDNA foi adicionado a 1280, 640, 320, 160 e 80 ng/mL (barras brancas) em diferentes intervalos de tempo (0, 6, 24 e 30h). *Diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle de crescimento (barras pretas) ($p < 0,05$).

8.3 Efeito do eDNA na sensibilidade antifúngica em biofilmes de *Trichosporon*

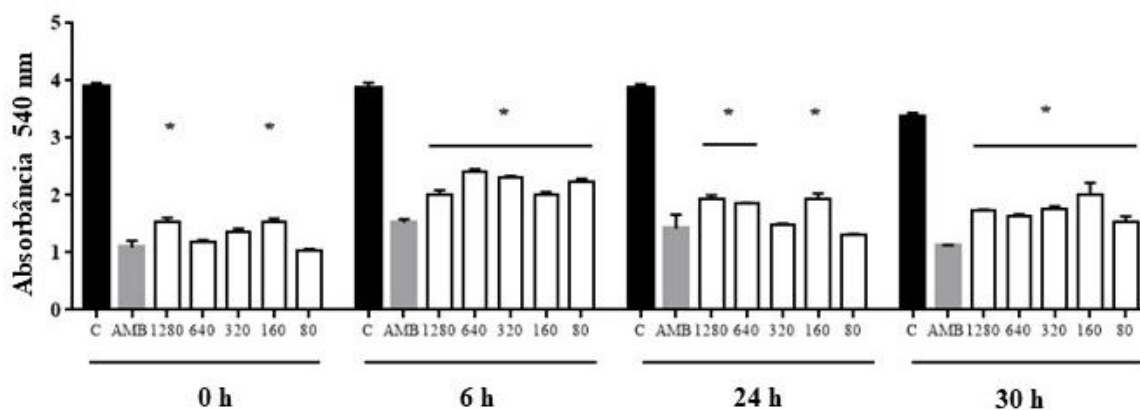
Observou-se que os biofilmes de *T. asahii* expostos ao eDNA, apresentaram maior tolerância aos antifúngicos AMB e VRZ, por vezes maior do que o crescimento livre de drogas, conforme observado pelo aumento da biomassa de ambas as espécies (Figura 16A e 16B). Para *T. inkin* a interferência do eDNA na sensibilidade foi menor, porém, presente em todos os estágios de desenvolvimento dos biofilmes (Figura 16C e 16D). Entretanto, VRZ teve menos ação quando adicionado eDNA nos últimos estágios de desenvolvimento.

T. asahii



T. inkin

C



D

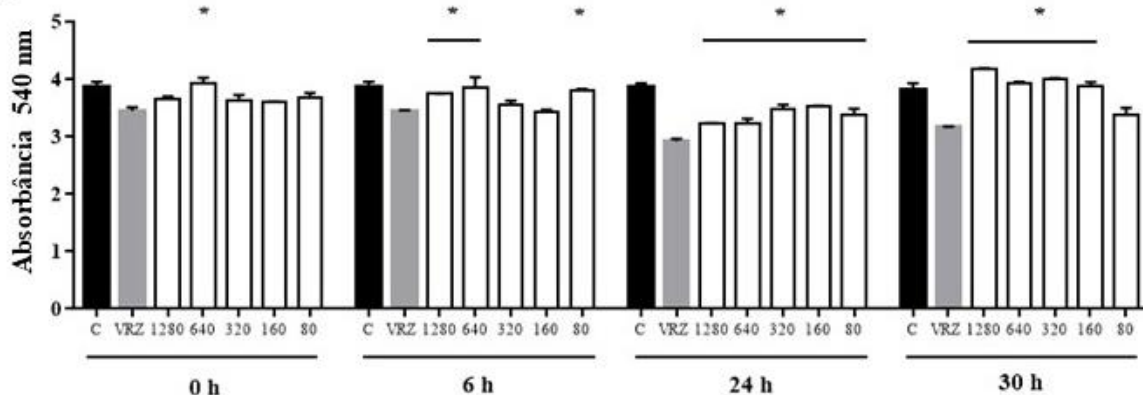


Figura 16: Efeito da adição de eDNA na sensibilidade antifúngica dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* (barras brancas). Biofilmes foram formados em meio RPMI e tratados com eDNA (160 ng/mL) em diferentes intervalos de tempo (0, 6, 24 e 30 h). Biofilmes maduros de 48 h foram então avaliados quanto à tolerância antifúngica a AMB (A; C) e VRZ (B; D). *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparados aos biofilmes tratados com cada antifúngico (barras cinza). O controle de crescimento (barras pretas) foi formado em meio RPMI sem antifúngicos.

8.4 Efeito do tratamento com DNase na sensibilidade antifúngica de biofilmes de *Trichosporon*

A DNase foi capaz de reduzir a biomassa dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* (Figura 17). Uma redução de até 90% na biomassa do biofilme de *T. asahii* foi observada após o tratamento com 2 mg/mL de DNase em comparação com o controle livre de drogas e até 65% em comparação com o biofilme tratado com VRZ (Figura 17B). O tratamento com DNase também foi capaz de aumentar a sensibilidade do biofilme de *T. inkin* ao VRZ (Figura 17D).

Não foi observada diferença significativa na sensibilidade à AMB após o tratamento com DNase (Figuras 17A, 17C).

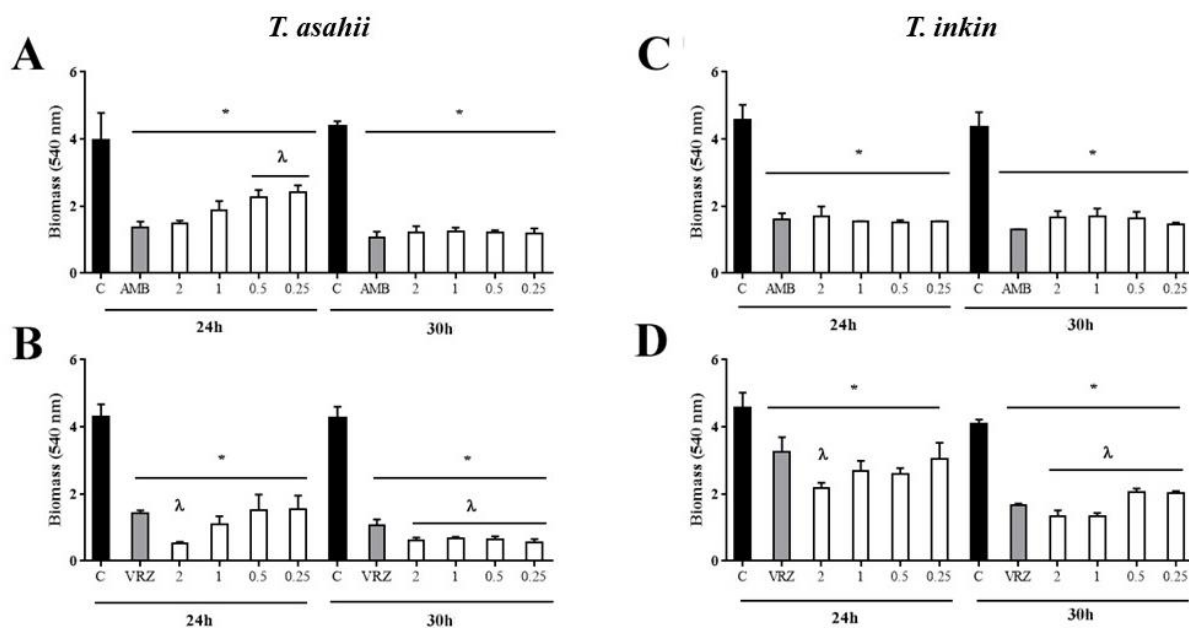


Figura 17: Efeito da DNase na suscetibilidade antifúngica de biofilmes de *T. asahii* (A, B) e *T. inkin* (C, D). Os biofilmes foram tratados com DNase após 24 h de desenvolvimento em meio RPMI. Biofilmes maduros foram então desafiados com anfotericina B (AMB) e voriconazol (VRZ) e avaliados quanto à produção de biomassa (barras brancas). λ Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparados aos biofilmes maduros desafiados com cada antifúngico (barras cinza). * Indica diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado com controles de crescimento (barras pretas) formados em meio RPMI sem antifúngicos.

8.5 Efeito do eDNA exógeno Morfologia e Ultraestrutura dos biofilmes de *Trichosporon*

8.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

Observou-se nas imagens de MEV que os biofilmes tratados com eDNA mostraram maior complexidade estrutural (Figura 18) em comparação com controles (Figura 18 A, B, E, F). Para os biofilmes tratados com eDNA (Figuras 18 C, D, G, H), visualizamos biofilmes profusos, com canais de água e material amorfo extracelular abundante.

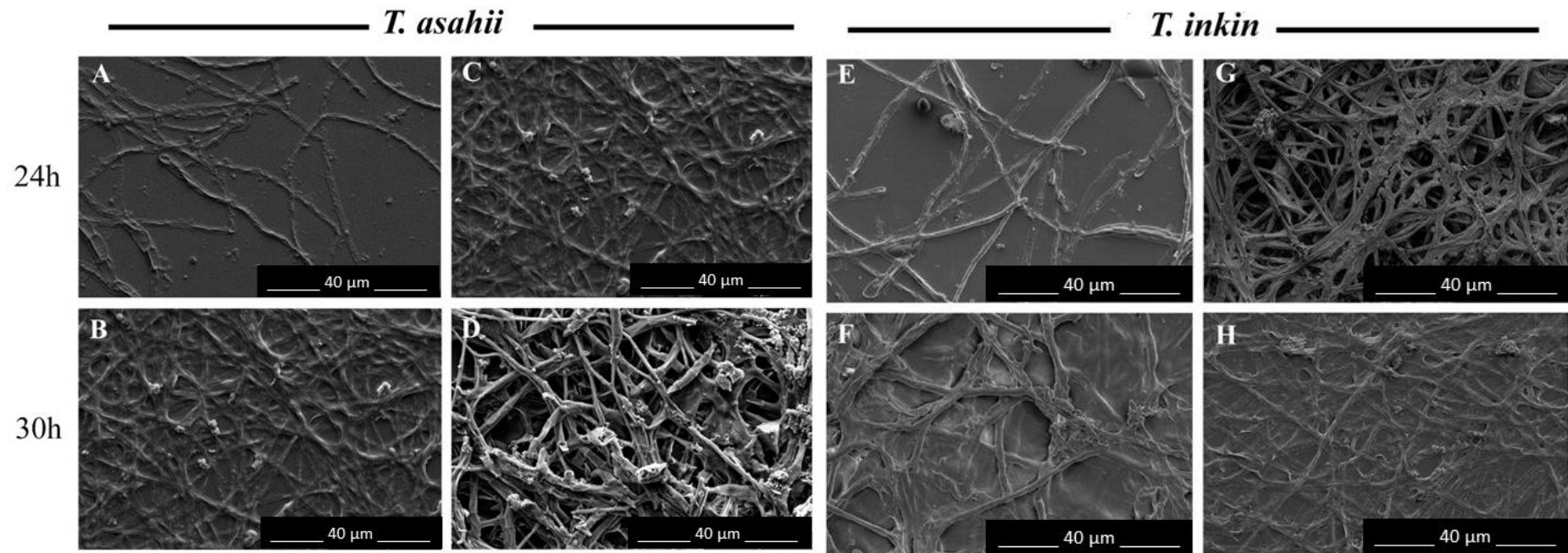


Figura 18: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes de *T. asahii* (A-D) e *T. inkin* (E-H) em meio RPMI como controles (A, B, E, F) e RPMI suplementado com 160 ng/mL eDNA (C, D, G, H) em 24 h e 30 h de incubação. Ampliação: 3000x; barra: 40µm.

8.5.2 Microscopia Confocal a Laser

As imagens de microscopia confocal nos mostraram que os biofilmes de *T. asahii* (Figura 19A) e *T. inkin* (Figura 19B) tratados com 160 $\mu\text{g/mL}$ de eDNA apresentaram mais células e maior espessura do que os biofilmes de controle sem eDNA. O aumento do biovolume foi observado apenas em biofilmes de 30 h para cepas de *T. asahii* e em 24 h em *T. inkin*.

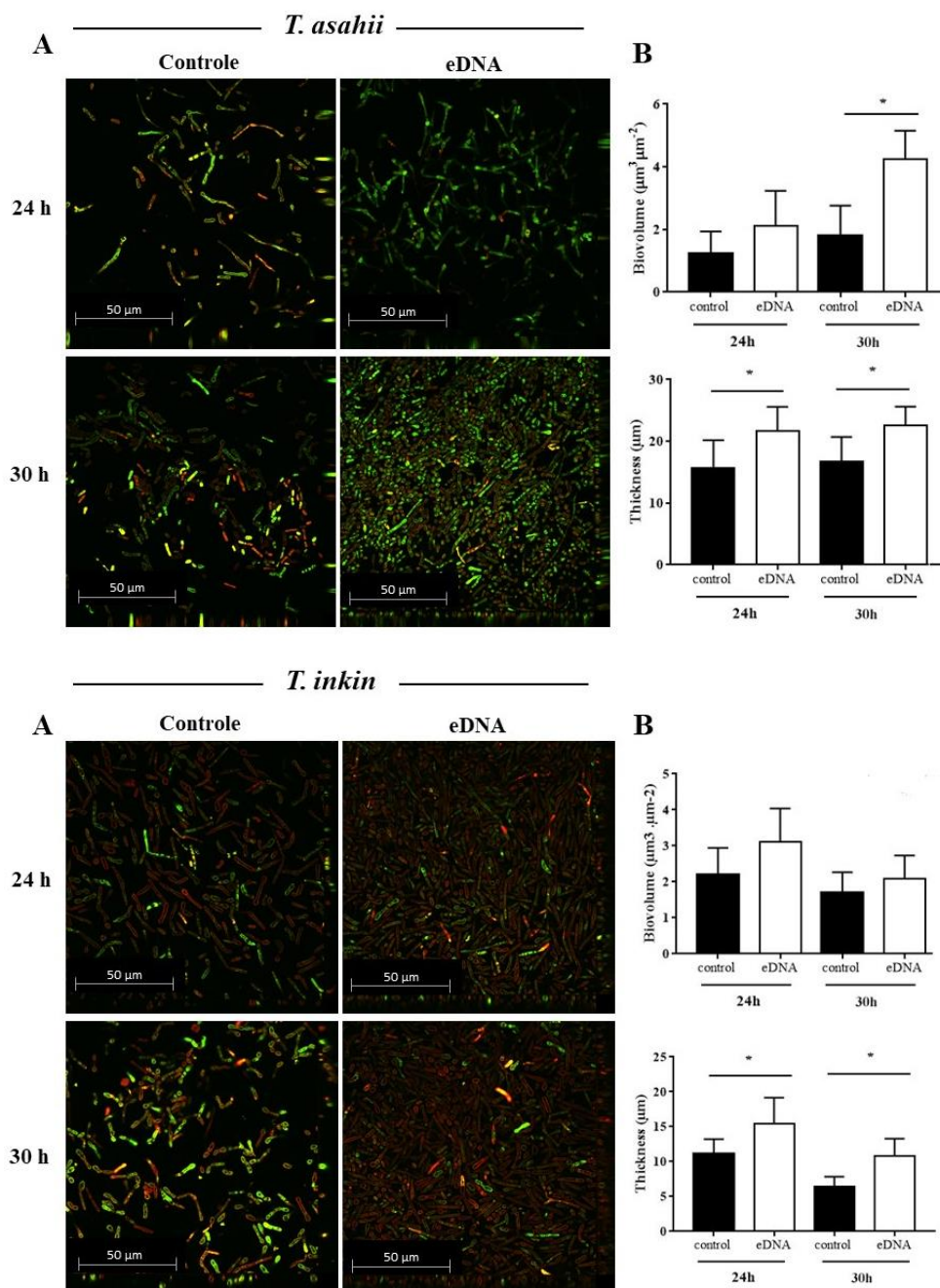


Figura 19: Microscopia confocal a laser de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* tratados com 160 ng/mL eDNA após 24 h e 30 h de desenvolvimento em meio RPMI (A). Efeito de eDNA exógeno na biomassa e espessura dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* (B). * Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparados aos controles de crescimento sem eDNA.

8.6 Efeito da DNase na Ultraestrutura dos biofilmes de *Trichosporon*

A DNase foi capaz de romper os biofilmes já formados de *Trichosporon*, inibiu a agregação celular e a adesão à superfície, desestabilizando a robustez do complexo estrutural dos biofilmes (Figura 20A). A DNase reduziu o biovolume e a espessura dos biofilmes maduros de *T. asahii* e *T. inkin* (Figura 20B). Aparentemente, este último parece ser mais sensível ao efeito DNase.

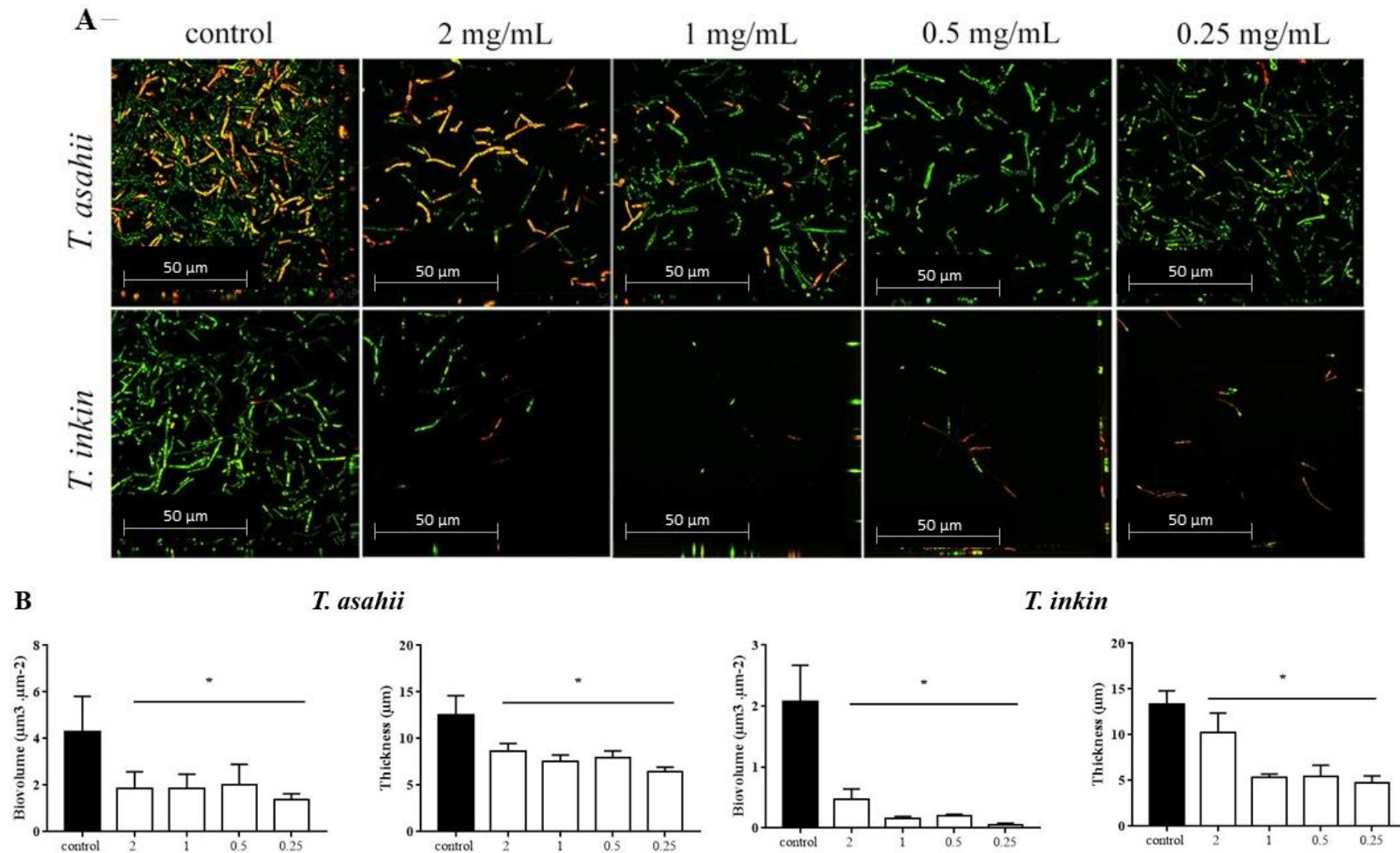


Figura 20: Microscopia confocal a laser de biofilmes maduros de *T. asahii* e *T. inkin* tratados com diferentes concentrações de DNase (A). Efeito da DNase na biomassa e espessura dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* (B). *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento sem DNase.

2ª PARTE EXPERIMENTAL

A segunda parte experimental gerou um artigo que será submetido ao periódico Mycoses, fator de impacto 4,931 e Qualis A1, com o referido título:

Role of extracellular DNA in the formation and tolerance of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* biofilms in urine simulant medium

9 RESULTADOS

9.1 Cinética de crescimento planctônico

No cultivo das células planctônicas de *T. asahii* CEMM 05-6-072 (Figura 21) e *T. inkin* CEMM 05-6-074 (Figura 22) no MSU e RPMI foi possível perceber o aumento de quantidade de células ao longo das horas, sendo evidenciado a formação de hifas, pseudo-hifas e artroconídeos. Podemos observar que o crescimento nos dois meios de cultivos foi equiparado ao longo das horas com formação de artroconídeos, pseudo-hifas e hifas artroconidiadas, características do crescimento de *Trichosporon* spp.. Ademais, em MSU na cepa de *T. asahii* nos momentos de 72 e 96 h foi possível observar estruturas arredondadas de paredes espessas semelhante a clamidoconídios.

Trichosporon asahii (CEMM 05-6-072)

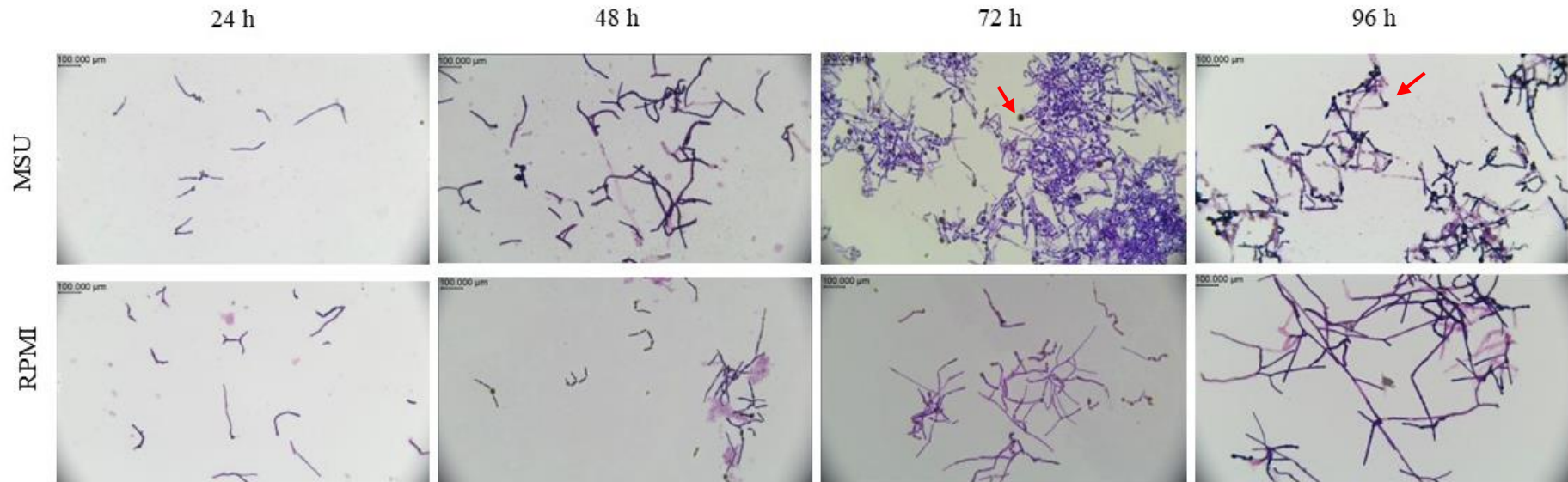


Figura 21: Microscopia óptica do crescimento planctônico de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) nos meios MSU e RPMI em diferentes horas de análise (24, 48, 72 e 96 h) corados pela técnica de Gram, Setas vermelhas mostrando os clamidoconídios. Aumento de 400x, magnitude 100 μm.

Trichosporon inkin (CEMM 05-6-074)

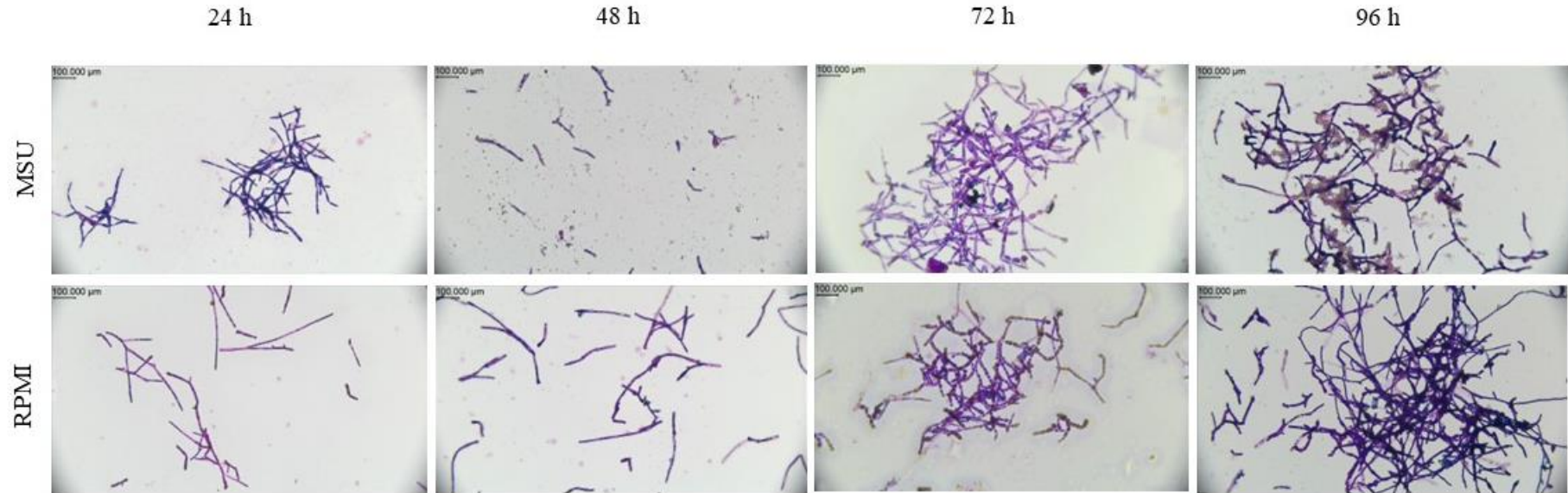


Figura 22: Microscopia óptica do crescimento planctônico de *T. inkin* (CEMM 05-6-074) nos meios MSU e RPMI em diferentes horas de análise (24, 48, 72 e 96 h) corados pela técnica de Gram. Aumento de 400x, magnitude 100 µm.

9.2 Cinética de formação de biofilme de *T. asahii* e *T. inkin* em MSU em comparação a RPMI

Ao observarmos a cinética de crescimento de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 no MSU, percebemos que houve pico de absorbância de biomassa nos tempos de 48 e 72 h de cultivo, sendo semelhante com o cultivo em meio RPMI com absorbância máxima de biomassa com 72 h de cultivo. Porém, a viabilidade celular foi crescente até o tempo de 96 h para cepa *T. asahii* para ambos os meios (Figura 23 A e C).

Quando avaliado a quantificação de biomassa e viabilidade celular da cepa de *T. inkin* percebemos biomassa máxima com 72 h de cultivo tanto no MSU quanto no RPMI (Figura 23 B) e a viabilidade celular em MSU foi com 72 h de cultivo, permanecendo constante com 96 h e no meio RPMI foi crescente em todas as horas testadas, ressaltando o melhor desenvolvimento de *T. inkin* em meio RPMI (Figura 23 B e D).

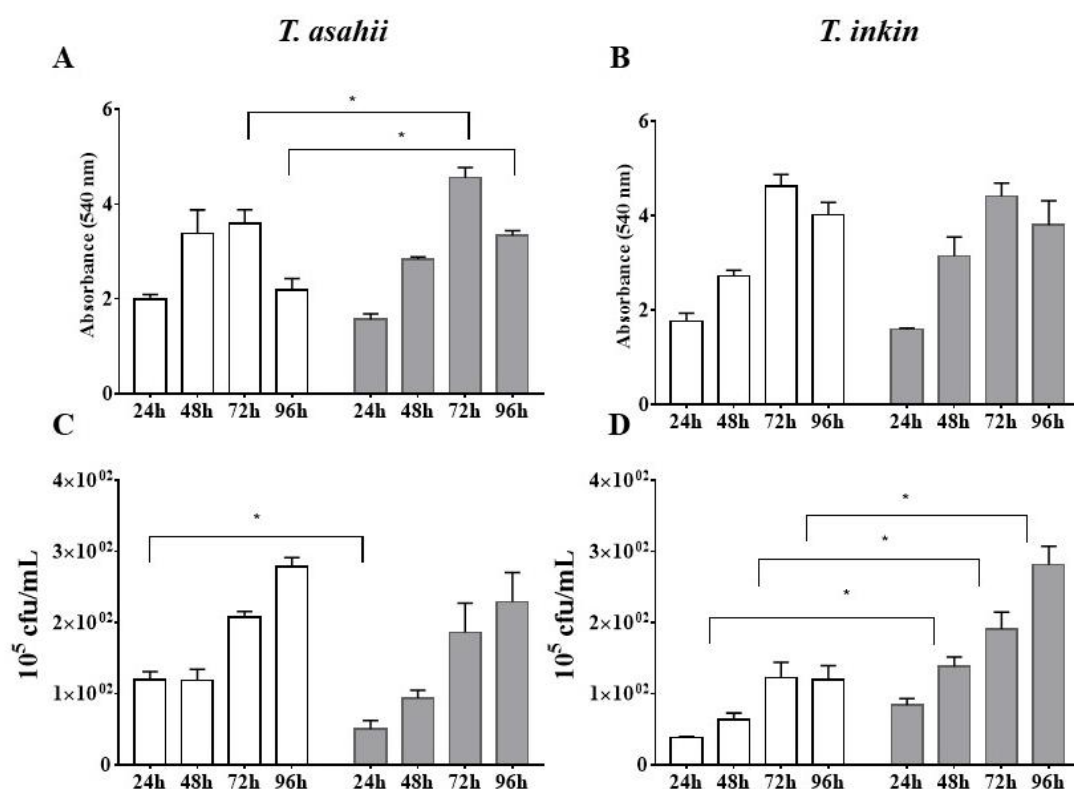


Figura 23: Quantificação de biomassa e viabilidade celular de *T. asahii* CEMM 05-6-072 (A e C) e *T. inkin* CEMM 05-6-074 (B e D) em MSU (barras brancas) em comparação com meio RPMI (barras cinzas) nos tempos 24, 48, 72 e 96 h de cultivo. *Diferença estatística em comparação do crescimento em MSU e RPMI.

9.3 Efeito do eDNA nos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* formados em MSU e RPMI

O eDNA aumentou a biomassa dos biofilmes em todas as horas testadas em comparação com os controles livres de eDNA, tendo um aumento de 66% quando em contato com eDNA no tempo de 72 h de desenvolvimento em MSU, e de 34% para o RPMI para cepa de *T. asahii* (Figura 24 A). Para a cepa de *T. inkin*, o eDNA aumentou a biomassa dos biofilmes nos tempos de 48 e 72 h, em cerca de 48% no MSU e 33% para o RPMI.

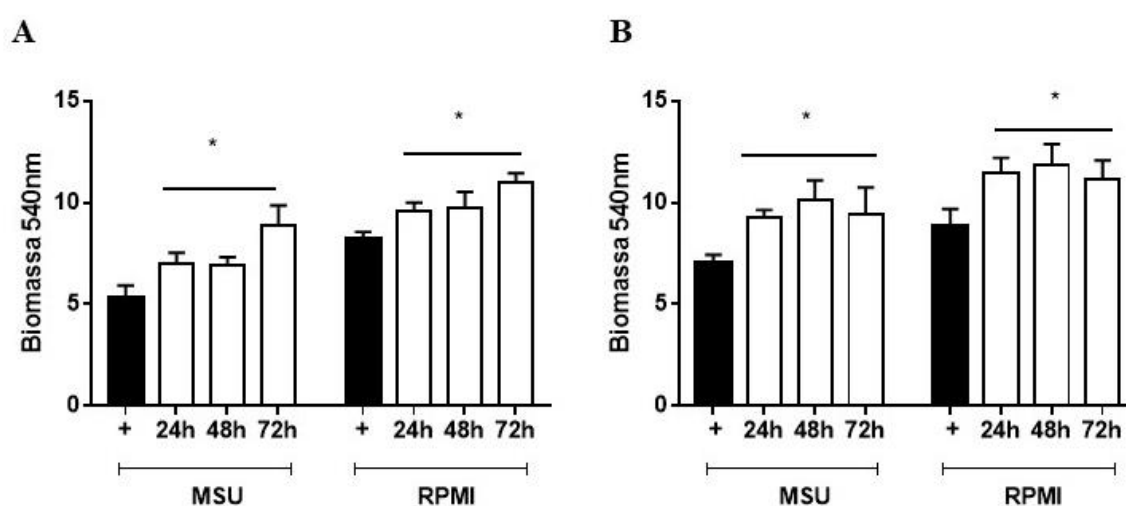


Figura 24: Efeito do eDNA na biomassa de *T. asahii* CEMM 05-6-072 em A e *T. inkin* CEMM 05-6-74 em B cultivados em MSU e RPMI analisados após 96 h de cultivo. eDNA foi adicionado na concentração de 160 ng/mL nos tempos de 24, 48 e 72 h de cultivo. * Diferença estatística significativa comparada com o controle (barras pretas).

9.4 Efeito do eDNA na sensibilidade antifúngica de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* formados em MSU e RPMI

Os biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* desafiados com os antifúngicos AMB e VRZ mostraram maior tolerância após o tratamento com eDNA, principalmente após 72 h de incubação, com aumento de biomassa de até 43% em relação ao biofilme sem exposição prévia ao eDNA (Figura 25), exceto para cepa de *T. inkin* no meio MSU quando tratado com VRZ, que não apresentou diferença estatística de crescimento.

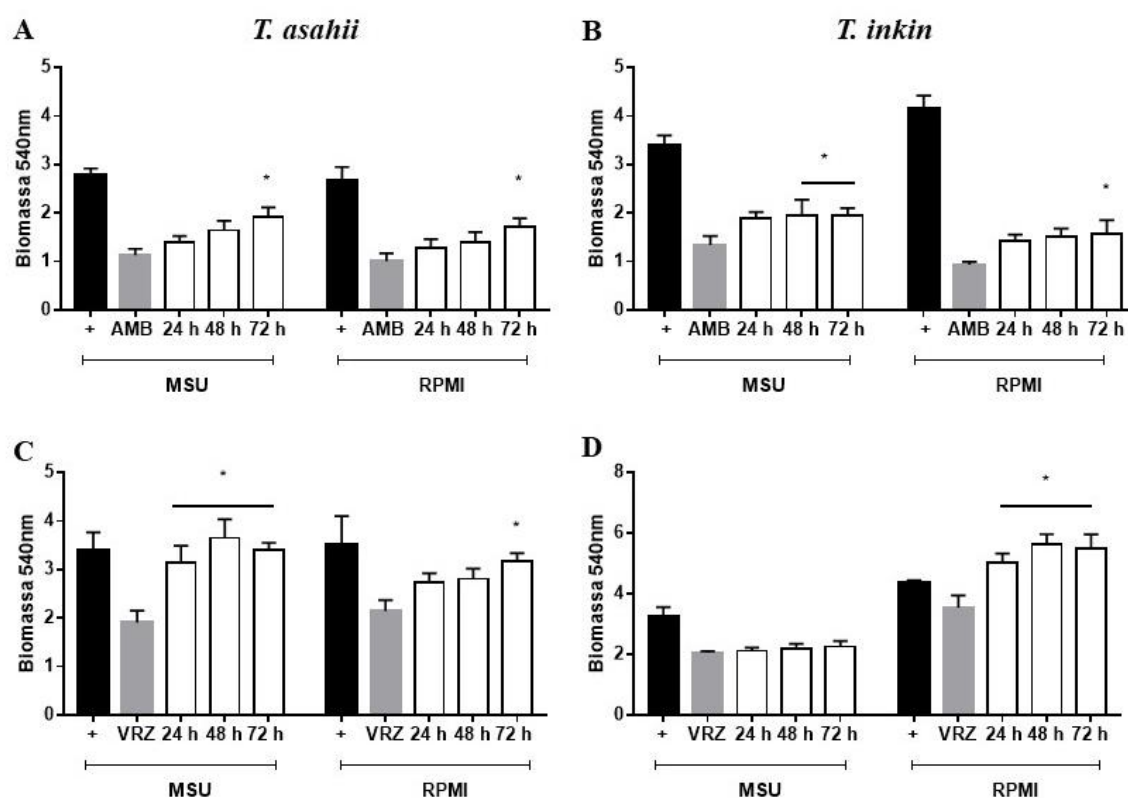


Figura 25: Efeito da adição de eDNA na sensibilidade dos biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 (barras brancas). Os biofilmes foram formados em MSU e meio RPMI pré-expostos a eDNA (160 ng/mL) em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 h). Após o biofilme maduro com 96 h foi desafiado com antifúngicos AMB (A e B) e VRZ (C e D). *Diferença estatística em comparação ao biofilme tratado com antifúngico (barras cinzas). Controle de crescimento (barras pretas) foi formado em meio MSU e RPMI livre de eDNA e antifúngico.

9.5 Morfologia e ultraestrutura de biofilme de *T. asahii* e *T. inkin* em MSU e RPMI

9.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

Na microscopia eletrônica de varredura, os biofilmes de *T. asahii* formados em MSU apresentaram estruturas monocamadas e pouca substância polimérica extracelular (Figura 26 A e B). Já quando observado após adição de eDNA, percebeu-se maior quantidade de células aderidas e sobrepostas em camadas (26 C e D).

Os biofilmes formados em meio RPMI após a adição de eDNA, percebeu-se que há mais células aderidas evidenciando camadas e formação dos canais de água e material amorfo extracelular denso (Figura 26 G e H), maior do que o crescimento sem eDNA (Figura 26 E e F).

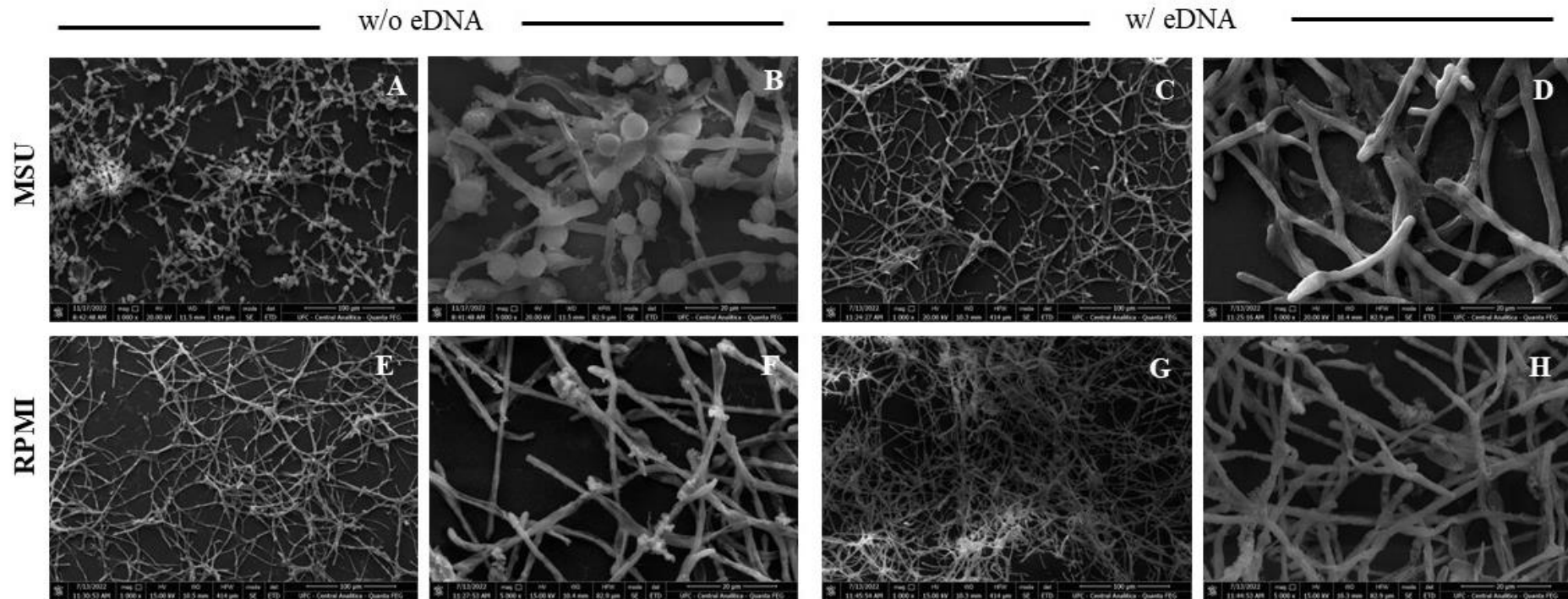


Figura 26: Imagem de MEV de biofilme de 96 h de *T. asahii* CEMM 05-6-072 em MSU e RPMI sem eDNA (A e B / E e F) e após adição de eDNA (160 ng/mL) com 72 h de cultivo (C e D / G e H). Magnitude de 1000x; bar 100 µm; Magnitude de 5000x; bar 20 µm.

Os biofilmes da cepa de *T. inkin* em meio MSU suplementado com eDNA apresentou um biofilme mais denso, com mais camadas (Figura 27 C e D) do que o biofilme sem adição de eDNA (Figura 27 A e B). Os biofilmes formados em meio RPMI com adição de eDNA tanto apresentou maior formação de canais e maior densidade, quanto maior substância amorfa extracelular (Figura 27 G e H) do que os biofilmes sem eDNA (Figura 27 E e F).

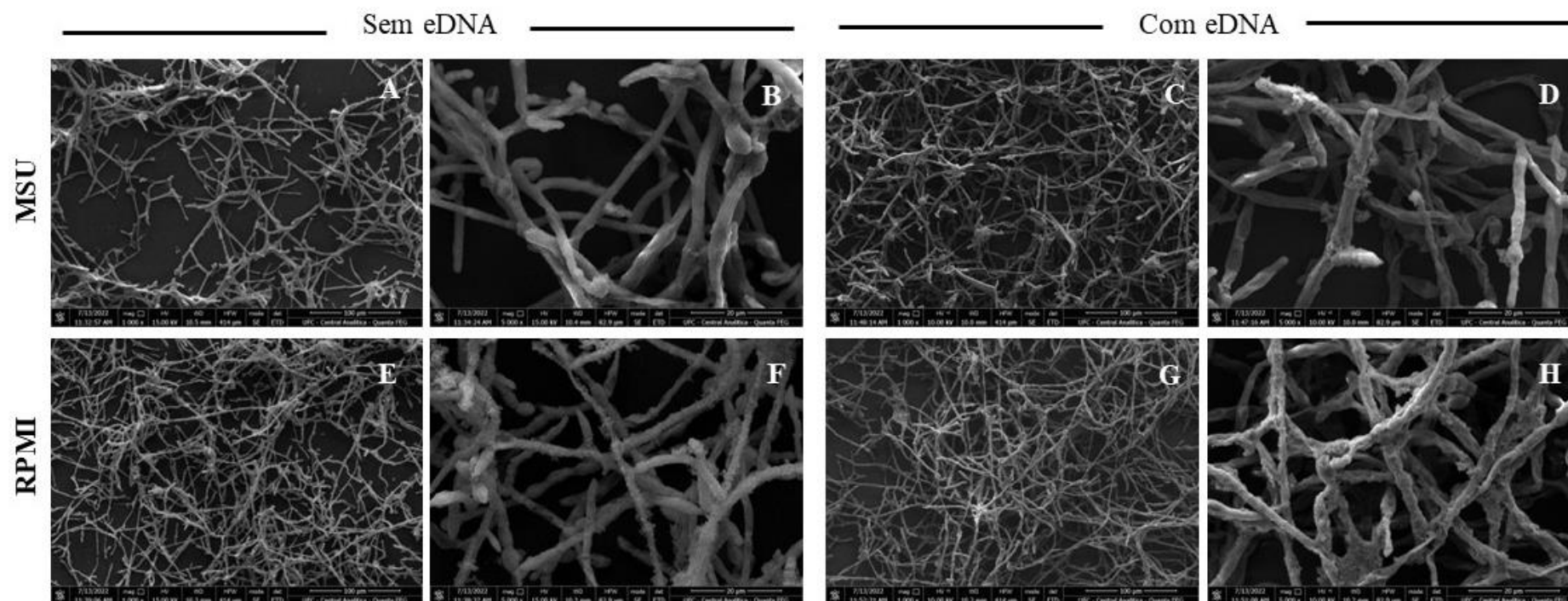


Figura 27: Imagem de MEV de biofilme de 96 h de *T. inkin* CEMM 05-6-074 em MSU e RPMI sem eDNA (A e B / E e F) e após adição de eDNA (160 ng/mL) com 72 h de cultivo (C e D / G e H). Magnitude de 1000x; bar 100 µm; Magnitude de 5000x; bar 20 µm.

9.5.2 Microscopia confocal a laser

Na microscopia confocal foi observado que os biofilmes de *T. asahii* cultivados em MSU na presença de eDNA apresentaram aumento de biovolume em cerca de 225% e espessura em cerca de 72% em comparação com biofilmes cultivados sem adição de eDNA. A microscopia quando

os biofilmes foram cultivados em meio RPMI na presença de eDNA apresentarem aumento de biovolume de 111% e espessura em cerca de 53% em comparação com o cultivo sem adição de eDNA (Figura 28).

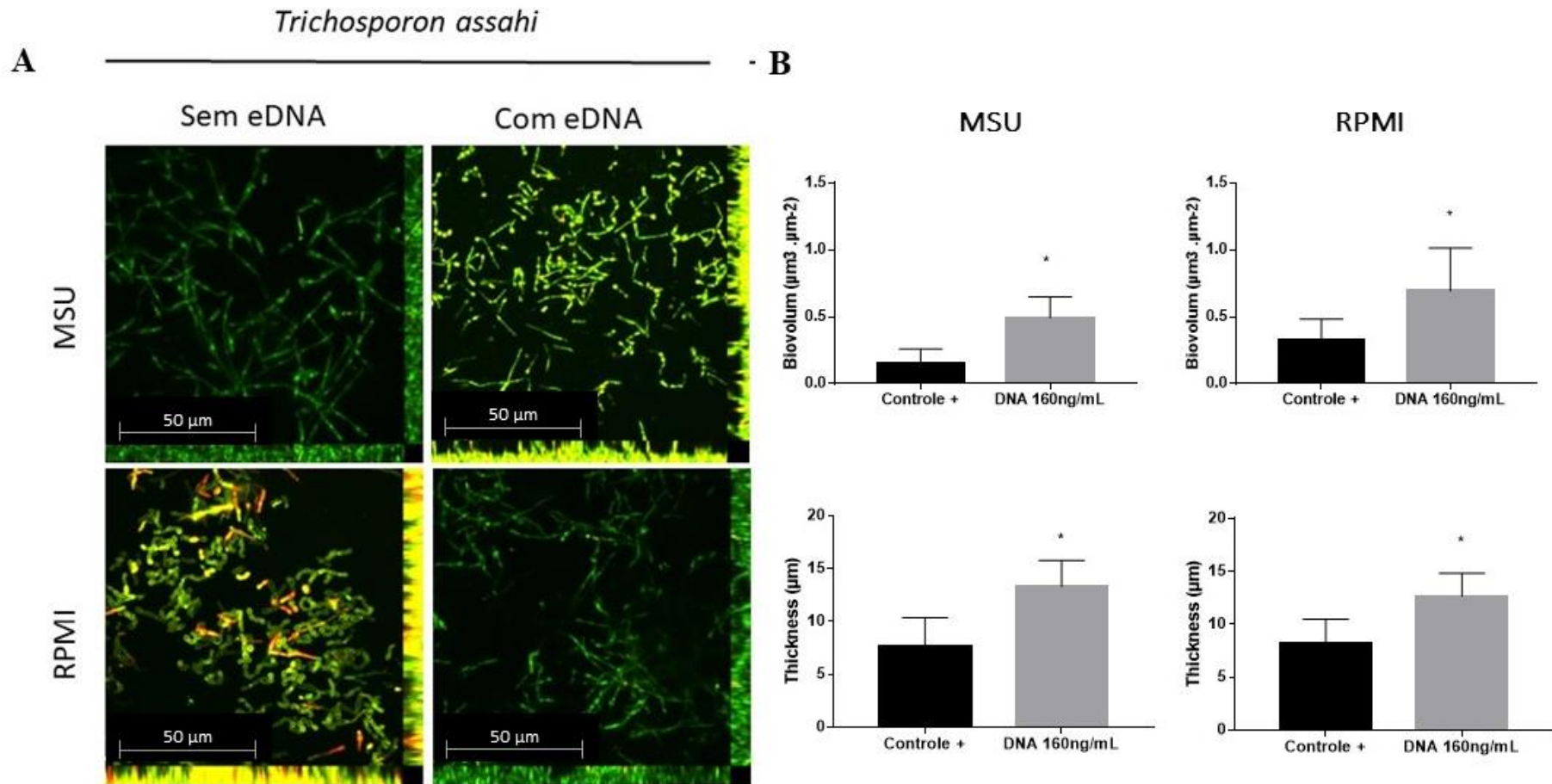


Figura 28: Microscopia confocal a laser de biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 de 96 h tratados com 160 ng/mL eDNA com 72 h de desenvolvimento em meio MSU e RPMI (A). Efeito do eDNA exógeno na biomassa e espessura dos biofilmes de *T. asahii* (B). *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento sem eDNA.

Os biofilmes de *T. inkin* em cultivados em MSU na presença de eDNA apresentaram bastante filamentação, maior biovolume em cerca de 78% e aumento de espessura em 41% do que os biofilmes sem adição de eDNA. O eDNA favoreceu o incremento de biovolume em 58% e espessura em quase 35% quando os biofilmes foram cultivados em meio RPMI (Figura 29).

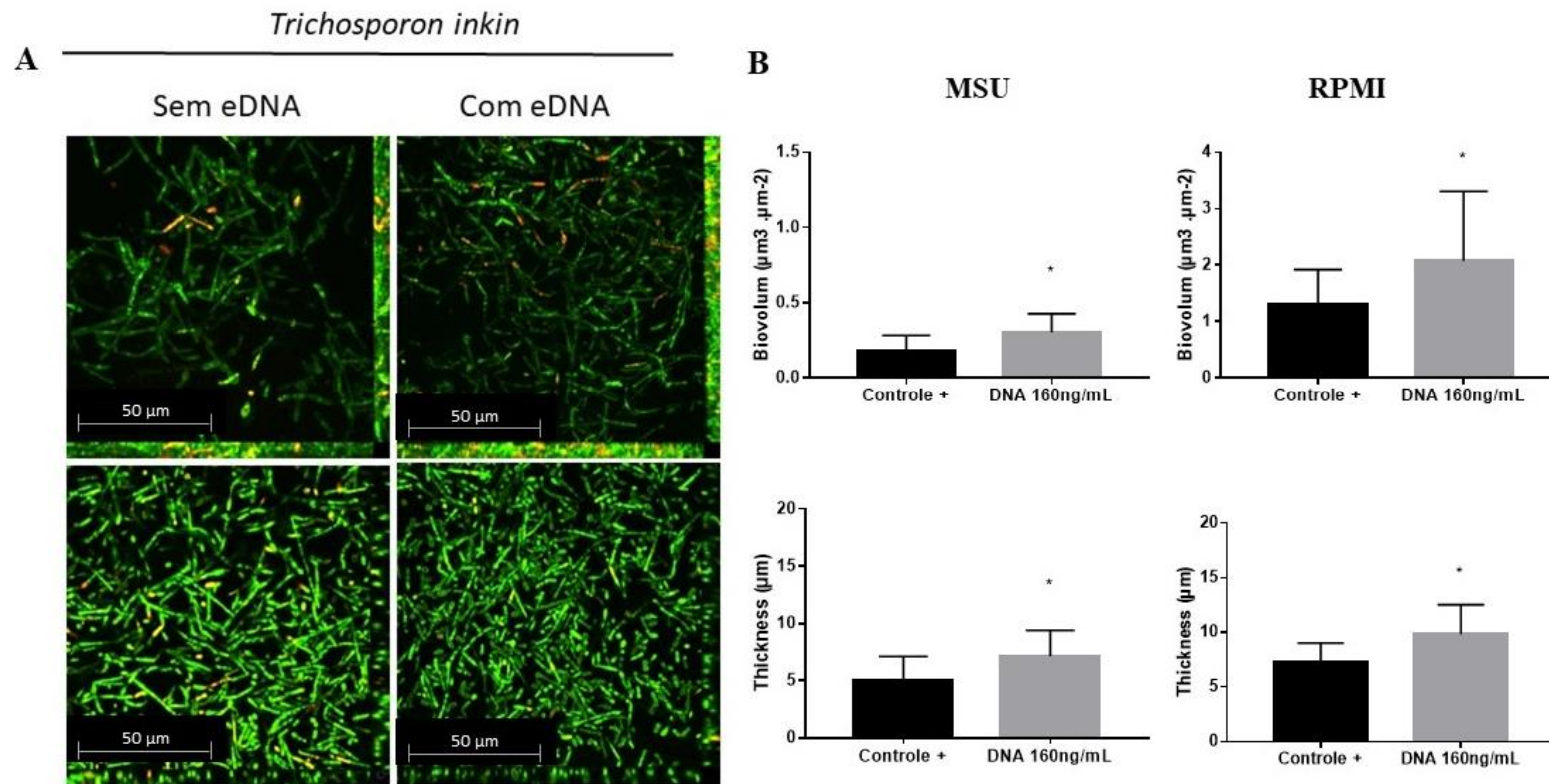


Figura 29: Microscopia confocal a laser de biofilmes de *T. inkin* CEMM 05-6-074 de 96 h tratados com 160 ng/mL eDNA com 72 h de desenvolvimento em meio MSU e RPMI (A). Efeito do eDNA exógeno na biomassa e espessura dos biofilmes de *T. asahii* (B). *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento sem eDNA.

DISCUSSÃO

Espécies do gênero *Trichosporon* são fungos basidiomicetos leveduriformes encontrados de forma ubíquo na natureza, como também fazem parte da microbiota transitória e residente do corpo humano (FOSTER et al., 2017; TENÓRIO et al., 2021). Porém podem ser patogênicos por serem capazes de burlar a resposta imunológica do hospedeiro causando infecções (TENÓRIO et al., 2021). Infecções fúngicas causadas por *Trichosporon* spp. estão cada vez mais recorrentes (LI et al., 2020; MALACRIDA et al., 2021), em especial, em pacientes hospitalizados e com alguma debilidade imunológica causada por doenças de base como diabetes mellitus, câncer hematológico, transplantados ou fazendo uso de corticoides por longo período (CAMPOS et al., 2021; FRANCISCO et al., 2019; MATTEDE et al., 2015).

Infecções causadas por *Trichosporon* spp. são a segunda causa de infecção fúngica hospitalar, ficando atrás apenas de *Candida* spp. (KOURTI; ROILIES et al., 2022), sendo responsável por um índice de mortalidade que variam de 30 a 90% (CASTANO et al., 2018; ESCARRÁ et al., 2017) e nos últimos anos, foi percebido um aumento de isolados de espécies de *Trichosporon* causando graves infecções do trato urinário (MATTEDE et al., 2015; URS et al., 2018; WERNEBURG, 2022). O quadro infeccioso se agrava pela ampla capacidade de *Trichosporon* spp. de formar biofilmes, principalmente em dispositivos médicos como cateter venoso central, sondas urinárias e implantes cardíacos (MARINÉ et al., 2015; RAMÍREZ et al., 2019). Trabalhos anteriores do nosso grupo já relataram que *Trichosporon* spp. é um ótimo modelo de formação de biofilme com consequente diminuição de sensibilidade à antifúngicos (CORDEIRO et al., 2018; CORDEIRO et al., 2019).

Assim, propomos estudar mais detalhadamente o processo de formação de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* e como o DNA extracelular influencia na manutenção estrutural desses biofilmes, mesmo após tratamento com antifúngicos. Para isso, avaliamos a capacidade dos isolados em formar biofilmes em meio RPMI 1640. Nossos resultados, mostraram que as cepas testadas de *T. asahii* e *T. inkin* são capazes de formar biofilmes robustos, bem estabelecidos com os canais de distribuição de água e nutrientes, como mostrado em estudos anteriores do nosso grupo, no qual relata que o *Trichosporon* é um ótimo modelo de estudo de biofilmes. (CORDEIRO et al., 2015; CORDEIRO et al., 2019).

Muitos estudos relatam o papel do eDNA para os biofilmes tanto bacterianos (IBÁÑEZ DE ALDECOA et al., 2017) quanto fúngicos (JAKUBOVICS et al., 2013; MARTINS et al., 2010), esse DNA é liberado pelas células, por meio de *Quórum sensing* para compor o complexo estrutural dos seus biofilmes (IBÁÑEZ DE ALDECOA et al., 2017; SUGIMOTO et al., 2018), como também, durante o crescimento planctônico (MARTINS et al., 2010). Essas moléculas podem desempenhar diversas funções no biofilme como (1) componente estrutural de comunidades sésseis e sua matriz extracelular; (2) fonte nutricional; (3) trocas genéticas e sinalizações dentro do biofilme; (4) resistência a antimicrobianos (IBÁÑEZ DE ALDECOA et al. 2017, KARYGIANNI et al. 2020). Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que culturas planctônicas e biofilmes de *T. inkin* liberam ácidos nucleicos para o meio extracelular (CORDEIRO et al. 2015). Portanto, levantamos a hipótese de que o eDNA pode ser um importante componente estrutural e funcional dos biofilmes de *Trichosporon*.

Portanto, avaliamos a liberação de eDNA durante o desenvolvimento dos biofilmes. Descobrimos que a quantidade de eDNA em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* aumentou de forma dependente da fase, e maiores quantidades de eDNA foram detectadas em biofilmes de 24 h e 48 h de desenvolvimento. Estudos anteriores confirmaram um padrão semelhante em biofilmes de *Aspergillus fumigatus* (RAJENDRAN et al. 2013) e *Candida albicans* (RAJENDRAN et al. 2014). A quantidade incipiente de eDNA detectada em matriz extracelular de biofilmes de *Trichosporon* pode ser um viés da metodologia empregada em nosso estudo, e novos experimentos devem ser realizados com técnicas de maior sensibilidade, como PCR quantitativo.

Estudos anteriores mostraram que o eDNA é capaz de aumentar a adesão celular e a formação de biofilme em *C. albicans* (MARTINS et al. 2010), *A. fumigatus* (SHOPOVA et al. 2013); *C. glabrata* e *C. tropicalis* (SAPAAR et al., 2014). No presente estudo, mostramos que o eDNA causou um efeito semelhante nos biofilmes de *Trichosporon* spp., embora não tenha sido observado um padrão regular em relação à concentração de eDNA e ao estágio do biofilme. Porém, a concentração de 160 ng/mL foi o suficiente para aumentar a biomassa e espessura dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* no meio RPMI nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Nossos dados indicam que o eDNA reduziu a sensibilidade dos biofilmes de *Trichosporon* à anfotericina B e ao voriconazol. Resultados semelhantes foram encontrados em outros patógenos fúngicos (SHOPOVA et al. 2013, MARTINS et al. 2010). Acredita-se que o eDNA reduza a passagem de antimicrobianos pela matriz extracelular; em bactérias, o eDNA

também quela cátions que, por sua vez, desencadeia uma resposta de resistência antimicrobiana (IBÁNEZ DE ALDECOA et al. 2017). Embora o mecanismo concreto da resistência antifúngica mediada pelo eDNA ainda seja desconhecido, acreditamos que as moléculas antifúngicas podem não penetrar adequadamente através do biofilme mais espesso induzido pelo eDNA.

O efeito exuberante induzido por eDNA em biofilmes de *Trichosporon* foi invalidado após o tratamento com DNase, no qual, desestabilizou a arquitetura do biofilme previamente formado. Portanto, é possível inferir que o eDNA tem um papel na complexidade estrutural dos biofilmes de *Trichosporon* e supomos que a enzima DNase tenha um efeito direto sob a matriz extracelular. A DNase também aumentou a sensibilidade dos biofilmes de *Trichosporon* ao VRZ. Em geral, a DNase reduz a biomassa das comunidades fúngicas sésseis (RAJEDRAN et al. 2013; SHOPOVA et al. 2013) e por esse motivo a enzima é considerada uma potencial estratégia terapêutica para o manejo de infecções fúngicas mediadas por biofilmes, especialmente em infecções por *Trichosporon* relacionadas a dispositivos médicos (OKSHEVSKY et al. 2015; RAJEDRAN et al. 2013).

Estudos recentes destacaram a interação entre eDNA e células imunes do hospedeiro durante infecções crônicas mediadas por biofilmes. Análises realizadas com implante de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em modelo murino e diretamente em amostras de pacientes com fibrose cística com infecção crônica levaram à hipótese de que o eDNA do hospedeiro forma um escudo físico passivo contra antibióticos catiônicos e fagócitos (ALHEDE et al. 2020). O eDNA de biofilmes de *C. albicans* pode atuar como um fator quimiotático eficaz e está envolvido na ativação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, aumentando a resposta inflamatória (SMOLARZ et al. 2021). Nosso estudo mostrou que o eDNA aumentou a biomassa e a tolerância antifúngica dos biofilmes de *Trichosporon* e, portanto, supomos que, assim como descrito para outros patógenos, o eDNA derivado de neutrófilos e macrófagos pode influenciar a fisiologia dos biofilmes de *Trichosporon* e, conseqüentemente, a fisiopatologia de tricosporonose invasiva (ALHEDE et al., 2020).

Tricosporonose invasiva acometendo o trato urinário está cada vez mais recorrente em pacientes submetidos a cuidados hospitalares, principalmente, quando se fazem uso de alguns dispositivo médico como sonda e cateter urinário com alto índice de resistência antifúngica (ACAMPORA et al., 2019; CRONYN et al., 2021; KHAN et al., 2015). Assim, propomos o estudo de caracterização do crescimento de células de *Trichosporon* e capacidade de formação

de biofilme em um meio simulando as características químicas do fluido urinário. Assim, nosso estudo demonstrou que *T. asahii* e *T. inkin* foram capazes de se desenvolver de forma planctônica no meio simulador de urina, no qual observamos crescente formação de estruturas celulares ao longo das horas, com formação de blastoconídio, pseudo-hifas, hifas verdadeiras e estrutura de resistência como o clamidoconídio, presente nas últimas horas analisadas, características de *Trichosporon* descrita por Chowdhary et al., (2004).

A formação de biofilmes é o fator de virulência de *Trichosporon* que mais influenciam a gravidade das infecções invasivas (ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; JARROS et al., 2022; MONTOYA et al., 2018; PEREIRA et al., 2022). Assim, evidenciamos que as células fúngicas de *Trichosporon* foram capazes de se aderirem entre si e a superfície formando biofilmes robustos, com alta biomassa em MSU, equiparado com os biofilmes obtidos em cultivo no meio RPMI 1640. Mostrando a versatilidade das células de *Trichosporon* em se desenvolverem em substratos com alta salinidade, pH baixos e pouca disponibilidade de nutrientes.

Já relatamos que o eDNA tem papel fundamental no aumento da biomassa e consequente aumento de resistência de biofilmes de *Trichosporon* quando cultivados em meio RPMI 1640 (PEREIRA et al., 2022), o que também foi evidenciado quando cultivado no MSU, ratificando a importância dessa molécula ser liberada para compor a integridade estrutural da matriz extracelular dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*. A manutenção dos biofilmes é um fator importante no agravamento do processo infeccioso por essas estruturas dificultarem a terapia antimicrobiana, sendo mais resistentes às drogas antifúngicas (CORDEIRO et al., 2021), o que foi observado não só para células de *Trichosporon*, como também *C. albicans* (MARTINS et al., 2010).

Por fim, nosso estudo apresentou evidências experimentais de que o eDNA heterólogo contribui para manter a estrutura e aumentar a tolerância antifúngica de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, formados em meio RPMI e em MSU. Este fato, pode ser o motivo do agravamento de infecções do trato urinário, culminando em tantos desfechos desfavoráveis da infecção (CRONYN et al., 2021). Com o nível atual de entendimento sobre os papéis fundamentais do eDNA na formação do biofilme, torna-se evidente que a degradação do eDNA representa uma abordagem altamente promissora no desenvolvimento de novas terapêuticas para tratar infecções associadas a formação de biofilmes de *Trichosporon*.

CONCLUSÃO

- Cepas de *T. asahii* e *T. inkin* formam biofilmes *in vitro* em meio RPMI e MSU.
- Os biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* liberam eDNA para o sobrenadante e para a matriz extracelular nas etapas de adesão, formação e biofilme maduro.
- A adição de DNA exógeno impacta na biomassa, viabilidade celular, morfologia e sensibilidade dos biofilmes de *Trichosporon*.
- A enzima DNase, isoladamente, e em combinação com os antifúngicos AMB e VRZ diminui a biomassa, viabilidade celular, morfologia e aumenta a sensibilidade dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.
- As cepas de *T. asahii* e *T. inkin* são capazes de crescer tanto na forma planctônica quanto na formam biofilmes em MSU.
- A adição de eDNA nos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* formados em meio simulador de urina aumenta a biomassa e diminui sensibilidade aos antifúngicos AMB e VRZ.

REFERÊNCIAS

- ACAMPORA, N.; FRIZZA, A.; BRAU, F.; TORELLI, R.; VELLA, A.; DE CAROLIS, E.; FANTONI, M. A case of *Trichosporon asahii* urinary tract infection in a frail elderly patient. **Le Infezioni in Medicina**, v. 27, n. 1, 2019.
- ALLESEN-HOLM, M.; BARKEN, K. B.; YANG, L.; KLAUSEN, M.; WEBB, J. S.; KJELLEBERG, S.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 4, 2006.
- ALHEDE, M.; ALHEDE, M.; QVORTRUP, K.; KRAGH, K. N.; JESEN, P. Ø.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections *in vivo*. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 2, 2020.
- ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1629, 2016.
- ANDRADE, I. B. Avaliação comparativa de fenótipos associados à virulência de isolados clínicos da família Trichosporonaceae. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. 2020.
- ARAÚJO, I. R. M.; MARQUES, S. G.; Tricosporonoses: etiologia, manifestações clínicas, diagnósticos laboratoriais, epidemiologia e tratamento. **CONNEPI**, 2010.
- BARNES, A. M. T.; BALLERING, K. S.; LEIBMAN, R. S.; WELLS, C. L.; DUNNY, G. M. *Enterococcus faecalis* Produces Abundant Extracellular Structures Containing DNA in the Absence of Cell Lysis during Early Biofilm Formation. **MBion**, v. 3, n. 4, 2012.
- BENTUBO, H. D. L.; GAMBALE, W.; FISCHMAN, O. Caracterização laboratorial e comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 15, n.1, p. 69-74, 2013.
- BONGOMIN, F.; OUT, A.; CALISTI, G.; RICHARDSON, M. D.; BANARD, J.; VENKATESWARAN, R.; VERGIDIS, P. *Trichosporon japonicum* Fungemia and Ventricular Assist Device Infection in an Immunocompetent Patient. **Open Forum Infectious Diseases**, 2019.
- BROKS, T.; KEEVIL, C. W. A Simple Artificial urine for the growth of urinary pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, 1997.
- CAMPOS, M. N. RAMOS, T. D.; CRUZ, L. N.; AZEVEDO, A. M. B.; ARANHA, D. B.; BUENOS, A. P. S.; SOUSA, A. M.; LAND, M. G. P.; VIANNA, D. T. Infecção fúngica invasiva por *Trichosporon asahii* em pacientes oncohematológico pediátrico. **Hematology, transfusion and cell therapy**. v. 43, n. S1, 2021.

CARVALHO, A. M. R.; MELO, L. R. B.; MORAES, V. L.; NEVES, R. P. Invasive *Trichosporon cutaneum* infection in an infant with wilms' tumor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 59-60, 2008.

CASTANO, G.; YARRARAPU, S. N. S.; MADA, P. K. Tricosporonose. **StatPerls Publishing**, 2022.

CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the Genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166, p. 121-132, 2008.

CHANG, Y. L.; YU, S. J.; HEITMAN, J.; WELLINGTON, M.; CHEN, Y. L. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, 2017.

CHIBA, AKLO, SUGIMOTO, SHINYA; SATO, SEIJI HORL; MIZUNOE, YOSHIMITSU. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. **Microbial biotechnology**. Tokio, v. 8, n. 3, 2015.

CHOWDHARY, A.; AHMARD, S.; KHAN, Z. U.; DOVAL, D. C.; RANDHAWA, H. S. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: a case report and an update. **India Journal of Medical Microbiology**. v. 22, n. 1, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard, 3rd ed. M27-A3. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**. v. 43, n.1, p. 23-30, 2007.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. **Clinical Microbiology Reviews**., v. 24, n. 4, p. 682-700, 2011.

CONG, L.; LIAO, Y.; YANG, S.; YANG, R. *In Vitro* Antifungal Activity of Sertraline and Synergistic Effects in Combination with Antifungal Drugs against Planktonic Forms and Biofilms of Clinical *Trichosporon asahii* Isolates. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. 1-12, 2016.

CORDEIRO, R. A.; AGUIAR, A. L. R.; SILVA, B. N.; PEREIRA, L. M. G.; PORTELA, F. V. M.; CAMARGO, Z. P.; LIMA-NETO, R. G.; CASTELO-BRANDO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G.; SIDIM, J. J. C. *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Frontiers in cellular and infection Micro biology**. v. 11, 2021a.

CORDEIRO, R. A.; PEREIRA, L. M. G.; SOUSA, J. K.; SERPA, R.; ANDRADE, A. R. C.; PORTELA, F. V. M.; EVANGELISTA, A. J. J.; SALES, J. A.; AGUIAR, A. L. R.; MENDES, P. B. L.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C.. M.; ROCHA, M. F. G. Farnesol inhibits planktonic cells and antifungal-tolerant biofilms of *Trichosporon asahii* and *T. inkin*. **Medical Mycology**, v. 0, n. 0, 2019.

CORDEIRO, R.A.; SERPA, R.; ALEXANDRE, C.F.U.; MARQUES, F.J.F.; MELO, C.V.S.; FRANCO, J.S.; EVANGELISTA, A.J.J.; CAMARGO, Z.P.; BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA,

M.F.G.; MOREIRA, J.L.B.; BANDEIRA, T.J.P.G; SIDRIM, J.J.C. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 159, p. 1-10, 2015.

CORDEIRO, R. A.; SILVA, B. N.; AGUIAR, A. L. R.; PEREIRA, L. M. G.; PORTELA, F. V. M.; ROCHA M. G.; PERGENTINO, M. L. M.; SALES, G. S.; SOUSA, J. K.; CAMARGO, Z. P.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SIDRIM, J. J. C. Vancomycin enhances growth and virulence of *Trichosporon* spp. planktonic cells and biofilms. **Medical Mycology**, 2021b.

CRONYN, V.; HOWARD, J.; CHIANG, L.; LE, L.; TIMS-COOK, Z.; GERTZ, A. M. *Trichosporon asahii* Urinary Tract Infection in a Patient with Severe COVID-19. **Case Reports in infectious diseases**, v, 2021, 2021.

DAS. T.; SEHAR, S; MANEFIEL, M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. **Environmental microbiology reports**, v. 5, n. 6, 2013.

DINIZ, L.M.; SOUZA FILHO, J.B. Estudo de 15 casos de pedra branca observados na Grande Vitória (Espírito Santo – Brasil) durante cinco anos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n, 1, p. 49-52, 2005.

DUARTE-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, F.; GONÇALVES, S. M.; GOLDMAN, G. H.; CARVALHO, A.; CUNHA, C.; The cell Biology of the *Trichosporon*-Host Interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.

ENOCH, D. A.; YANG, H.; ALIYU, S. H.; MICALLET, C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. **Human fungal pathogen identification**, v. 1508, 2017.

ESCARRÁ, F.; LEMA, J.; CARACCILO, B.; CARNOVALE, S.; ÁLVAREZ, V.; TRAMONTI, N.; GUARRACIANO, F.; ROSANOVA, M. T. *Trichosporon asahii* sepsis associated with urinary catheter in a pediatric burn unit: 2 case reports. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 115, n. 5, p. 311-314, 2017.

GUÉHO, E.; DE HOOG, G. S.; SMITH, M. T. Neotypification of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 61, n. 4, p. 285 – 288, 1992.

GUÉHO, E.; IMPROVISI, L.; DE HOOG, G. S.; DUPONT, B. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**. v. 37, n.1-2, p. 3-10, 1994.

FERREIRA, F. R.; POLLO, T; PEREIRA, M. T. F.; BUERI, M. N. P. *Piedra Branca* por *Trichosporon ovoides* no Sudeste do Brasil: relato e breve revisão da literature. **Revista Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, v. 77, n. 2, 2019.

FONSECA, F. L.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; FISCHMAN-GOMPERTZ, O.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L. Structural and functional properties of the *Trichosporon asahii* glucuronoxylomannan. **Fungal Genet. Biol.**, v. 46, 2009.

FOSTER, C. E.; EDWARDS, M. S.; BRACKETT, J.; SCHADY, D. E.; HEALY, C. M.; BAKER, C. J. Trichosporonosis in pediatric patients with a hematologic disorder. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**. v. 7, n. 3, 2017.

FRANCISCO, E. C.; DE ALMEIDA JUNIOR, J. N.; DE QUEIROZ TELLES, F.; AQUINO, V. R.; MENDES, A. V. A.; DE ANDRADE BARBERINO, M. G. M.; DE TARSO O CASTRO, P.; GUIMARÃES, T.; HAHN, R. C.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 25, n. 7, 2019.

FRAZER, C.; HERNDAY, A. D.; BENNET, R. J. Monitoring phenotypic switching in *Candida albicans* and the use of next-gen fluorescence reporters. **Curr Protoc Microbiol**. v. 53, n. 1, 2019.

GALDIERO, E.; ALTERIIS, E.; NATALE, A.; D'ALTERIO, A.; SICILIANO, A.; GUIDA, M.; LOMBARDI, L.; FALANGA, A.; GALDIERO, S. Eradication of *Candida albicans* persister cell biofilm by the membranotropic peptide gH625. **Scientific Reports**. 2020.

GUO, LI-NA; YU, SHU-YING; HSUEH, PO-REN; AL-HATMI, ABDULLAH M. S.; MEIS, J. F.; HAGEN, F.; XIAO, M.; WANG, HE.; BARRESI, C.; ZHOU, MENG-LAN; SYBREN DE HOOG, G.; XU, YING-CHUN. Invasive Infections Due to *Trichosporon*: species distribution, Genotyping, and antifungal, susceptibilities from a multicenter study in China. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 57, n° 2, 2019.

ICHIKAWA, T.; SUGITA, T.; WANG, L.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K.; NISHIKAWA, A. Phenotypic switching and β -N-Acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. **Microbiol. Immunol.**, v. 48, n. 4, p. 237–242, 2004.

ITURRIETA-GONZÁLEZ, I. A.; PADOVAN, A. C. B.; BIZERRA, F. C.; HAHN, R. C.; COLOMBO, A. L.. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109553, 2014.

JAKUBOVICS, N. S.; SHIELDS, R. C.; RAJARAJAN, N.; BURGESS, J. G. Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. **Letters in Applied Microbiology**. v.57, 2013.

JARROS, I. C.; BARROS, I. L. E.; PRADO, A.; CORRÊA, J. L.; MALACRIDA, A. M.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. *Rhodotorula* sp. And *Trichosporon* sp. are more virulent after a mixed biofilm. **Mycopathologia**, v. 187, n. 1, 2022.

JENSEN, R. H. Resistance in human pathogenic yeast and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in the humans and the environment. **Danish Medical Journal**, 2016.

KARYGIANNI, L.; REN, Z.; KOO, H.; THURNHEER, T.; Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 8, 2020.

LIU, X. Z.; WANG, Q. M.; GÖKER, M.; GROENEWALD, M.; KACHALKIN, A. V.; LUMBSCH, H. T.; MILLANES, A. M.; WEDIN, M.; YURKOV, A. M.; BOEKHOUT, T.; BAI, F-Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, v. 81, 2015.

LO, E.; NICOLLE, L. E.; COFFIN, S. E.; GOULD, C.; MARAGAKIS, L. L.; MEDDINGS, J.; PEGUES, D. A.; PETTIS, A. M.; SANTO, S.; YOKOE, D. S. Strategies to prevent catheter-associated urinary tract infections in acute care hospitals. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 5, 2014.

MATTEDE, M. G. S.; PIRAS, C.; MATTEDE, K. D. S.; FERRARI, A. T.; BALDOTTO, L. S.; ASSBU, M. S. Z. Urinary tract infections due to *Trichosporon* spp. In severely ill patients in an intensive care unit. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 27, n. 3, 2015.

MALACRIDA, A. M.; SALCI, T. P.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Insight into the antifungals used to address human infection due to *Trichosporon* spp.: a scoping review. **Future Microbiology**, 2021.

MARINÉ, M.; BROWN, N. A.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; GOLDMAN, G. H. On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by *Trichosporon* Species. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 12-21, 2015.

MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; OLIVEIRA, R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. **Mycoses**. V. 55, 2011.

MARTINS M.; UPPULURI P.; THOMAS D. P.; CLEARY I. A.; HENRIQUES M.; LOPEZ-RIBOT J. L.; OLIVEIRA R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, 2010.

MILAN, E. P.; SILVA-ROCHA, W. P.; ALMEIDA, J. J. S.; FERNANDES, T. U. G. PRUDENTE, A. L. de A.; AZEVEDO, M. F.; FRANCISCO, E. C.; MELO, A. S. de A.; COLOMBO, A. L.; CHAVES, G. M. *Trichosporon inkin* meningitis in Northeast Brazil: first case report and review of the literature. **BMC Infectious Diseases**, 2018.

MÖHRENSCHLAGER, M. Rezepte gegen Nagelpilz. **Fortbildung**, 2019.

MONTOYA, A. M.; GONZÁLEZ, A. S.; PALMAS-NICOLÁS, J. P.; GÓMEZ-TREVIÑO, A.; GONZÁLEZ, J. G.; GONZÁLEZ, G. M. Genotyping, extracellular compounds, and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated from Mexican patients. **Medical Mycology**, v. 53, n. 5, p 505-511, 2015.

MONTOYA, A.M.; GONZÁLEZ, G.M. *Trichosporon* spp.: an emerging fungal pathogen. **Med. Univers.**, v. 16, n. 62, p. 37-43, 2014.

MONTOYA, A. M.; ELIZONDO-ZERTUCHE, M.; TREVIÑO-RANGEL, R. J.; BECERRIL-GARCIA, M.; GONZÁLEZ, G. M. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 1, 2018.

NICHELE, S. M.; ZIMMERMANN, E. S.; BRUCHER, N. Monitoramento terapêutico de voriconazol no manejo de infecções fúngicas invasivas. **Disciplinarum Scientia/ saúde**, v. 20, n. 2, 2019.

OLIVIEIRA, D. K.; CARDOSO, A. M. Biofilmes microbianos: um desafio para saúde. **News Lab**, 2018.

PEREIRA, L. M. G.; ANDRADE, A. R. C.; PORTELA, F. V. M.; AGUIAR, A. L. R.; DA SILVA, B. N.; MOURA, S. G. B.; PERGENTINO, M. L. M.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO BRANCO, D. S. C. M.; CORDEIRO, R. A. Heterologous extracellular DNA facilitates the development of *Trichosporon asahii* and *T. inkin* biofilms and enhances their tolerance to antifungals. **Biofouling**, 2022.

RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; LAPPIN, D. F.; NILE, C. J.; SMITH, K.; WILLIAMS, C.; MUNRO, C. A.; RAMAGE, G. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. **BMC Microbiology**, v.14, n. 303, 2014.

RAJENDRAN, R.; WILLIAMS, C.; LAPPIN, D. F.; MILLINGTON, O.; MARTINS, M.; RAMAGE, G. Extracellular DNA release acts as an antifungal resistance mechanism in mature *Aspergillus fumigatus* biofilms. **Eukaryotic Cell**. v,12, n.3, 2013.

ROBLES-TENÓRIO, A.; LEPE-MORENO, K. Y.; MAYORA-RODRIGUEZ, J. White *Piedra*, a rare superficial mycosis: an update. **Current Fungal Infection Reports**, 2020.

SADAMOTO, S.; SHINOZAKI, M.; NAGI, M.; NIHONYABNAGI, Y.; EJIMA, K.; MITSUDA, A.; WAKAYAMA, M.; TOCHIGI, N.; MURAKAMI, Y.; HISHIMA, T.; NEMOTO, T.; NAKAMURA, S.; MIYAZAKI, Y.; SHIBUYA, K. Histopathological study on the prevalence of trichosporonosis in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue autopsy sections by in situ hybridization with peptide nucleic acid probe. **Medical Mycology**, v. 58 n.4, 2020.

SAPAAR, B.; NUR, A.; HIROTA, K.; YUMOTO, H.; MURAKAMI, K.; AMOH, T.; MATSUO, T.; ICHIKAWA, T.; MIYAKE, Y. Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 6, 2014.

SHOPOVA, I.; BRUNS, S.; THYWISSEN, A.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A. A.; HILLMANN, F. Extrinsic extracellular DNA leads to biofilm formation and colocalizes with matrix polysaccharides in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in Microbiology**. v, 6 n. 4, 2013.

SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Média à Luz dos Autores Contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, N.; NERY, J.; DIAS, A.; Aspartic Proteinases of *Candida* spp.: Role in Patogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 57, n. 1, 2014.

- SILVESTRE JUNIOR, A. M. **Sistemática molecular de *Trichosporon* spp. baseada em genes ribossomais e sua correlação com fatores de virulência e epidemiologia.** 2009. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SINGH A.; NYATI, A.; MOHTA, A.; KUSHWAHA, R. K.; JAIN, S. K. A case of scalp White Piedra caused by *Trichosporon ovoides*. **International Journal of Trichology**. v. 11, n. 3, 2019.
- SMOLARZ, M.; ZAWROTNIAK, M.; SATALA, D.; RAPALA-KOZIK, M. Extracellular nucleic acids present in the *candida albicans* biofilm trigger the release of neutrophil extracellular traps. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 26, n.11, 2021.
- SUGIMOTO, SHINYA; SATO, FUMIYA; MIYAKAWA, REINA; CHIBA, AKIO; ONODERA, SHOICHI; HORI, SEIJI; MIZUNOE, YOSHIMITSU. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, n. 8, p. 1-11, 2018.
- SUGITA T.; IKEDA, R.; NISHIKAWA, A. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer -type hypersensitivity pneumonitis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, 2004.
- TENÓRIO, A. R.; RIVAS-LÓPEZ, R. A.; BONIFAZ, A.; TARANGO-MARTÍNEZ. Tricosporonose mucocutânea disseminada em pacientes com sarcoma histiocítico. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 5, 2021.
- TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégia de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-138, 2013.
- TRETER, J.; MACÊDO, A. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, 2011.
- TURNBULL, L.; TOYOFUKU, M.; HYNEN, A. L.; KUROSAWA, M.; PESSI, G.; PETTY, N. K.; OSVATH, S. R.; OYARCE-CÁRCAMO, G.; GLOAG, E. S.; SHIMONI, R.; OMASITS, U.; ITO, S.; YAP, X.; MONAHAN, L. G.; CAVALIERE, R.; AHRENS, C. H.; CHARLES, I. G.; NOMURA, N.; EBERL, L.; WHITCHURCH, C. B. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicle and biofilms. **Nature communications**, v. 7, 2016.
- URS, T. A.; KADIYALA, V.; DEEPAK, S.; KARTHIK, K. M. Catheter associated urinary tract infections due to *Trichosporon asahii*. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 10, n. 4, 2018.
- VAZQUEZ, J. A. *Trichosporon* Infection. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 1, p. 52-58, 2010.

WERNEBURG, G. T. Catheter-Associated Urinary Tract Infections: Current Challenges and Future Prospects, **Research and Reports in Urology**, v. 4, 2022.

WHITCHURCH, C. B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P. C.; MATTICK, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v. 295, n. 5559, 2002.

ZARNOWSKI, R.; WESTLER, W.M.; LACMBOUH, G. A.; MARITA, J. M.; BOTHE, J. R.; BERNHARDT, J.; SAHROUI, A. L. H.; FONTAINE, J.; SANCHEZ, H.; HATFIEL, R. D.; NTAMBI, J. M.; NETT, J. E.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01333-14, 2014.

ANEXO A



Biofouling
The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research

Biofouling

The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gbif20>

Heterologous extracellular DNA facilitates the development of *Trichosporon asahii* and *T. inkin* biofilms and enhances their tolerance to antifungals

Lívia Maria Galdino Pereira, Ana Raquel Colares de Andrade, Fernando Victor Monteiro Portela, Ana Luiza Ribeiro Aguiar, Bruno Nascimento da Silva, Santiago Gonçalves Bezerra Moura, Mariana Lara Mendes Pergentino, Marcos Fábio Gadelha Rocha, José Júlio da Costa Sidrim, Débora de Souza Collares Maia Castelo Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro

To cite this article: Lívia Maria Galdino Pereira, Ana Raquel Colares de Andrade, Fernando Victor Monteiro Portela, Ana Luiza Ribeiro Aguiar, Bruno Nascimento da Silva, Santiago Gonçalves Bezerra Moura, Mariana Lara Mendes Pergentino, Marcos Fábio Gadelha Rocha, José Júlio da Costa Sidrim, Débora de Souza Collares Maia Castelo Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro (2022): Heterologous extracellular DNA facilitates the development of *Trichosporon asahii* and *T. inkin* biofilms and enhances their tolerance to antifungals, *Biofouling*, DOI: [10.1080/08927014.2022.2130788](https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2130788)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2130788>



Published online: 09 Oct 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 2








View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gbif20>

Heterologous extracellular DNA facilitates the development of *Trichosporon asahii* and *T. inkin* biofilms and enhances their tolerance to antifungals

Livia Maria Galdino Pereira^a, Ana Raquel Colares de Andrade^a, Fernando Victor Monteiro Portela^a, Ana Luiza Ribeiro Aguiar^a , Bruno Nascimento da Silva^a , Santiago Gonçalves Bezerra Moura^a, Mariana Lara Mendes Pergentino^a, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{a,b} , José Júlio da Costa Sidrim^a , Débora de Souza Collares Maia Castelo Branco^a and Rossana de Aguiar Cordeiro^a 

^aDepartment of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ^bSchool of Veterinary, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil

ABSTRACT

Trichosporon asahii and *T. inkin* are emergent agents of deep-seated and disseminated infections in immunocompromised patients. The present study aimed to investigate the role of extracellular DNA (eDNA) and the enzyme deoxyribonuclease (DNase) on the structure of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms, as well as to examine their effect on the susceptibility to antifungals. Biofilms reached maturity at 48 h; eDNA concentration in the supernatant increased over time (6 < 24 h < 48 h). Exogenous eDNA increased biomass of *Trichosporon* biofilms at all stages of development, enhanced their tolerance to antifungals and improved their structural complexity. DNase reduced biomass, biovolume and thickness of *Trichosporon* biofilms, thereby rendering them more susceptible to voriconazole. The results suggest the relevance of eDNA in the structure and antifungal susceptibility of *Trichosporon* biofilms and highlight the potential of DNase as adjuvant in biofilm control.

ARTICLE HISTORY

Received 19 November 2021
 Accepted 24 September 2022

KEYWORDS

Trichosporon; eDNA; DNase; amphotericin B; voriconazole

Introduction

Trichosporon species are yeast-like basidiomycetes that belong to human skin and gut mycobiota (Mariné et al. 2015) but are also found in the soil and indoor environments (Carvalho et al. 2014). The genus comprises 51 species, and approximately 16 of them are considered pathogenic (Taverna et al. 2014; Mariné et al. 2015). *T. asahii* and *T. inkin* have been considered rare but frequent fatal pathogens among *Trichosporon* species (Bongomin et al. 2019).

Invasive trichosporonosis are opportunistic infections that occur in immunocompromised patients, mainly those with hematological malignancies (Ramírez and Moncada 2020). Clinical evidences suggest that these infections may be mediated by biofilms formed on implanted medical devices (Iturrieta-Gonzalez et al. 2014; Bongomin et al. 2019), which hinders the eradication of the infectious process and may lead to high mortality rates (Sugimoto et al. 2018).

Trichosporon spp. are prone to form biofilms on biotic and abiotic surfaces (Cordeiro et al. 2015; Kurakado et al. 2020). These are well structured

communities encased by a self-produced, polymer-rich extracellular matrix (Sugimoto et al. 2018). Experimental studies have shown that *Trichosporon* biofilms present increased tolerance to antifungals, being the inhibitory concentrations up to hundreds or thousands of times higher than those for planktonic cells (Cordeiro et al. 2015).

Extracellular DNA (eDNA) is a major component of the extracellular matrix (ECM) of microbial biofilms (Martins et al. 2012) and its role on biofilm development and tolerance to antimicrobials have been described (Martins et al. 2010; Sugimoto et al. 2018). *In vitro* studies showed that DNase-treated biofilms are more susceptible to antimicrobials (Martins et al. 2012) and, therefore, eDNA had been proposed as a target for biofilm control (Martins et al. 2010; Martins et al. 2012; Okshevsy and Meyer 2015).

The present study aimed to investigate the role of eDNA on *T. asahii* and *T. inkin* biofilms. First, we investigated the presence and quantified the amount of endogenous eDNA in *Trichosporon* biofilms. Then, eDNA was added to biofilms upon different stages of development and the sessile cells were investigated

regarding their structure and tolerance to amphotericin B and voriconazole. The effect of DNase on biofilm structure and antifungal susceptibility was also investigated.

Material and methods

Mikroorganisms

Clinical isolates of *T. asahii* (CEMM 05-6-072, GenBank JX124945, urine) and *T. inkin* (CEMM 05-6-074, GenBank JX124953, urine) were evaluated. The strains belong to the Culture Collection of the Medical Mycology Specialized Center (CEMM) of the Federal University of Ceará, Brazil. Strain identification was based on micromorphology analysis on malt agar (De Hoog et al. 2000) and sequencing of the IGS region of the rDNA (Rodríguez-Tudela et al. 2005).

Kinetics of eDNA release during biofilm development

eDNA release was evaluated at 6, 24, 48 and 72 h intervals. *T. asahii* and *T. inkin* biofilms were formed in 96-well plates with 10^6 cells/mL inoculum in buffered RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) at pH 7.0 and incubated at 35 °C under 80 rpm agitation (Cordeiro et al. 2015).

At each time interval, supernatants of biofilms were collected and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. Wells containing biofilms were aspirated to remove unadhered cells, filled with PBS-Tween 80, scraped, sonicated for 1 min, then vortexed for 1 min. Both materials were filtered through a 0.22 µm pore filter membrane (Kasvi, Brazil) (Martins et al. 2012; Liao et al. 2014) and analyzed for eDNA concentration using the Quant-iT BR DNA quantification kit (Invitrogen, USA) in a Qubit device (Thermo Fisher, USA). Results were correlated with biomass (Peeters et al. 2008) and metabolic activity of biofilms (Martinez and Casadevall 2006). Experiments were conducted in triplicate in two independent tests.

Effect of exogenous eDNA treatment on biofilm biomass

Biofilms were formed as described previously and at 0, 6, 24 and 30 h of incubation, eDNA (low molecular weight salmon sperm DNA; Sigma-Aldrich, USA) was added at different concentrations (1280, 640, 320, 160 and 80 ng/mL) (Martins et al. 2010). Biofilms were then incubated up to 48 h at 35 °C under 80 rpm agitation. Afterwards, wells were washed with PBS-

Tween 80 to remove non-adhered cells and the biomass was quantified (Peeters et al. 2008). Biofilms without exogenous eDNA were used as controls. Experiments were conducted in triplicate in two independent tests.

Effect of exogenous eDNA and DNase treatments on biofilm susceptibility to antifungals

Biofilms were treated with exogenous eDNA (160 ng/mL) at different time intervals (0, 6, 24 and 30 h) and evaluated for antifungal tolerance. The effect of DNase was evaluated in 24 h and 30 h-biofilms. Sessile cells were treated with DNase bovine pancreas enzyme (Sigma-Aldrich, EUA) at different concentrations (2, 1, 0.5, 0.25 mg/mL) and incubated for additional 24 h (Martins et al. 2010).

Supernatants of 48 h-biofilms treated with eDNA or DNase were aspirated and the sessile cells were challenged with amphotericin B (AMB; Sigma-Aldrich, EUA) at 64 µg/mL for *T. asahii* and 8 µg/mL for *T. inkin*; voriconazole (VRZ; Sigma-Aldrich, EUA) was tested at 64 µg/mL for both species (Cordeiro et al. 2015). Biofilms were incubated for additional 48 h at 35 °C under 80 rpm agitation and then analyzed for biomass (Peeters et al. 2008). Experiments were performed in triplicate in two independent tests.

Ultrastructural morphology

For Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) analysis, *Trichosporon* biofilms were formed on Thermanox™ slides (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) in 24-well plates for 48 h. Biofilms treated with eDNA (160 ng/mL) were analyzed by SEM and CLSM; biofilms treated with DNase (2; 1; 0.5; 0.25 mg/mL) were analyzed by CLSM.

Mature biofilms were fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.15 M with 0.1% alcian blue. After 18 h at 4 °C, biofilms were washed twice with cacodylate buffer and dehydrated in an ascending ethanol series [50, 70, 80, 95 and 100% (twice); 10 min each]. Slides were dried with hexamethyldisilazane (Polysciences Europe, Germany) for 30 min, coated with 10 nm gold (Emitech Q150T, Lewes, UK) and observed in a SEM (FEI Inspect S50, Thermo Fisher Scientific, Hillsboro, Oregon, USA) in the high vacuum mode at 15 kV (Di Bonaventura et al. 2006; Cordeiro et al. 2015). Captured images were processed using *Photoscape*, v.3.6.5 (MooiTech, Korea).

For CLSM, 48 h-biofilms were stained with LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit (Invitrogen, California, EUA), containing SYTO 9 and propidium iodide. Images were performed with a series of horizontal (x-y) optical sections in a confocal microscope Nikon C2+ (Nikon, Japan). For image analysis, seven equidistant points were selected from the biofilm three-dimensional images and the colorimetric quantification was performed with Z-slice, using the software ImageJ 1.50i (Collins 2007).

Statistical analysis

Data were analyzed using Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test. P-values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, USA).

Results

Kinetics of endogenous eDNA release during biofilm development

eDNA was released into the extracellular medium, both in the supernatant and in ECM (Figure 1). Endogenous eDNA concentration in the supernatant increased over time in *T. asahii* and *T. inkin* biofilms, however eDNA content in ECM of both species remained constant.

Effect of exogenous eDNA on trichosporon biofilms

Exogenous eDNA at 1280, 640, 320, 160 or 80 ng/mL increased the biomass of *Trichosporon* biofilms at all stages of biofilm development, reaching up to 50% increment in biomass for both species, as observed in Figure 2.

Effect of exogenous eDNA on the antifungal susceptibility of trichosporon biofilms

Biofilms showed more tolerance to AMB and VRZ after treatment with eDNA, as observed by the increase in the biomass of both species (Figure 3). These results were observed with all concentrations of eDNA, regardless of the biofilm development stage.

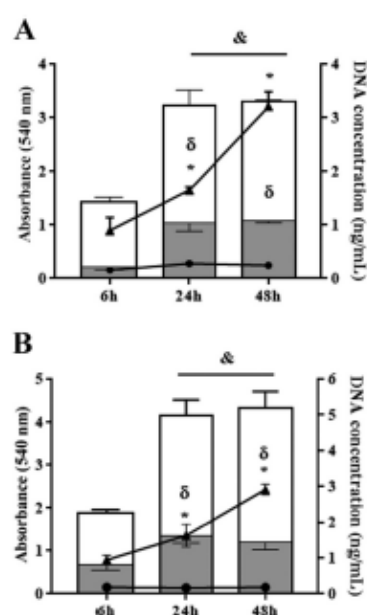


Figure 1. Metabolic activity (grey bars), biomass (white bars), and DNA concentration in extracellular matrix (ECM) and supernatant (SN) of *T. asahii* (A) and *T. inkin* (B) biofilms. Measurements were taken in 6 h, 24 h and 48 h-biofilms formed in RPMI medium at 35 °C. Statistically significant differences of metabolic activity (δ), biomass (∞), and supernatant DNA (*) when compared to 6 h-biofilms ($p < 0.05$).

Effect of DNase treatment on antifungal susceptibility of trichosporon biofilms

DNase reduced the biomass of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms (Figure 4). A reduction of up to 90% in the biomass of *T. asahii* biofilm was observed after treatment with 2 mg/mL DNase compared to the drug-free control and up to 65% compared to VRZ-treated biofilm (Figure 4B). DNase treatment was also able to increase the susceptibility of *T. inkin* biofilm to VRZ (Figure 4D). No significant difference was observed in the susceptibility to AMB after treatment with DNase (Figure 4A and C).

Ultrastructural morphology

Effect of exogenous eDNA on biofilm morphology
eDNA-treated biofilms showed increased structural complexity (Figure 5) in comparison with controls (Figure 5A, B, E, and F). Profuse biofilms, with water canals and abundant extracellular amorphous

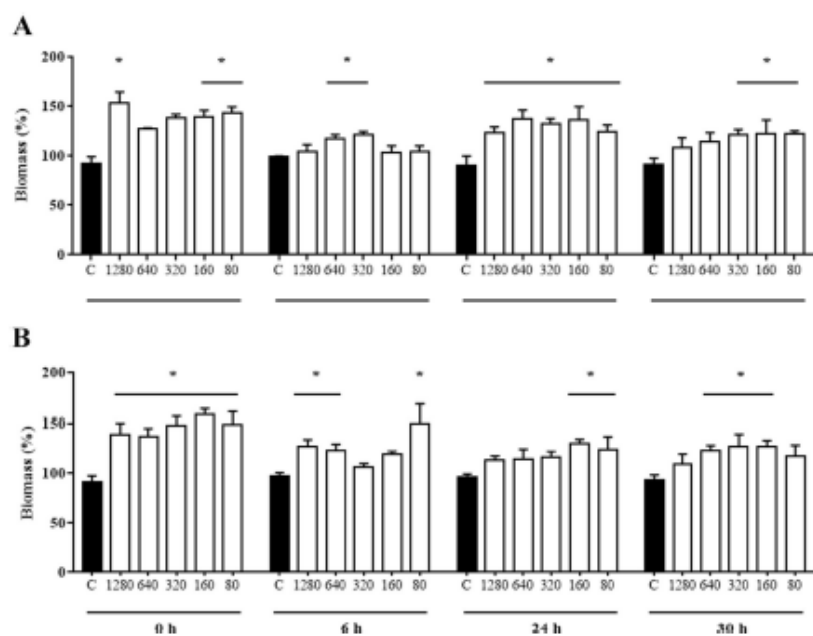


Figure 2. Effect of exogenous eDNA on biomass of *T. asahii* (A) and *T. inkin* (B) 48-h-biofilms. eDNA was added at 1280, 640, 320, 160, and 80 ng/mL (white bars) at different time intervals (0, 6, 24 and 30 h). *Statistically significant differences when compared to growth control (black bars) ($p < 0.05$).

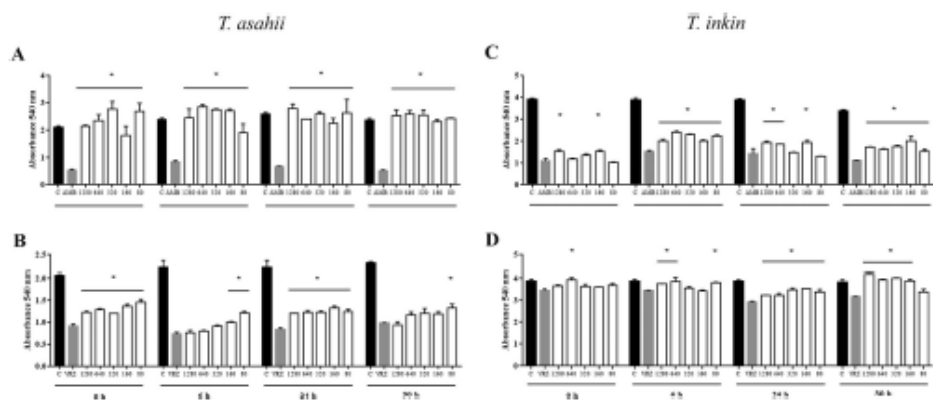


Figure 3. Effect of eDNA addition on antifungal susceptibility of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms (white bars). Biofilms were formed in RPMI medium and treated with eDNA (160 ng/mL) at different time intervals (0, 6, 24 and 30 h). Mature 48-h-biofilms were then evaluated for antifungal tolerance to AMB (A, C) and VRZ (D, E). *Statistically significant differences ($p < 0.05$) when compared to biofilms treated with each antifungal (grey bars). Growth control (black bars) were formed in RPMI medium without antifungals.

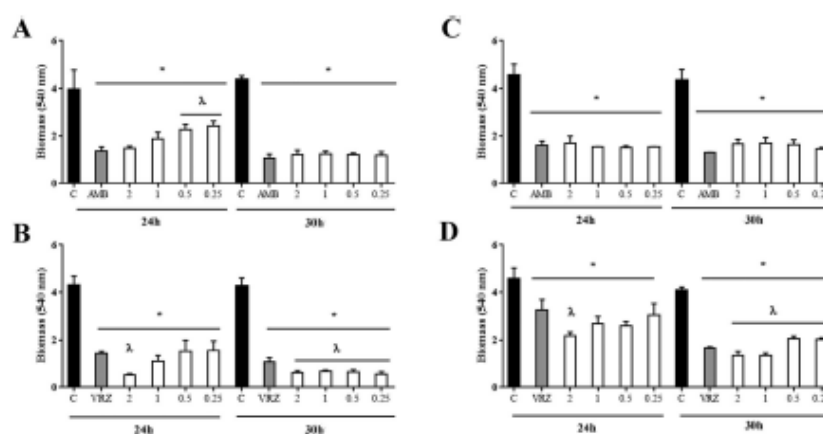


Figure 4. Effect of DNase on antifungal susceptibility of *T. asahii* (A, B) and *T. inkin* (C, D) biofilms. Biofilms were treated with DNase after 24 h and 30 h of development in RPMI medium. Mature biofilms were then challenged with amphotericin B (AMB) and voriconazole (VRZ) and evaluated for biomass production (white bars). ^aStatistically significant differences ($p < 0.05$) when compared to mature biofilms challenged with each antifungal (grey bars). * Indicates significant differences ($p < 0.05$) when compared with growth controls (black bars) formed in RPMI medium without antifungals.

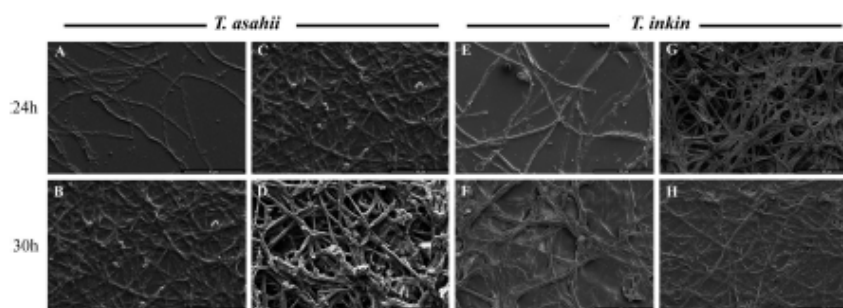


Figure 5. SEM images of *T. asahii* (A-D) and *T. inkin* (E-H) biofilms on RPMI medium as controls (A, B, E, F) or RPMI supplemented with 160 ng/mL eDNA (C, D, G, H) at 24 h and 30 h of incubation. Magnification: 3000 \times ; bar: 40 μ m.

material, were observed in biofilms treated with eDNA (Figure 5C, D, G, and H).

CLSM images showed that *T. asahii* and *T. inkin* biofilms treated with 160 μ g/mL eDNA presented more cells (Figure 6A) and were thicker than control biofilms (Figure 6B); increasing in biovolume was observed only in 30 h-biofilms (Figure 6B).

Effect of DNase on biofilm structure

DNase was able to disrupt *Trichosporon* biofilms, inhibiting cell aggregation and adhesion to surface (Figure 7A). DNase reduced biovolume and thickness of mature *T. asahii* and *T. inkin* biofilms (Figure 7B); apparently, the latter seems to be more susceptible to DNase effect.

Discussion

Several studies have shown that bacterial and fungal pathogens are able to release eDNA within their biofilms (Ibáñez de Aldecoa et al. 2017, Jakubovics et al. 2013), and also during planktonic growth (Martins et al. 2010). These molecules can have several functions in the biofilm such as (1) structural component of sessile communities and their ECM; (2) nutritional source; (3) genetic exchanges within the biofilm; (4) resistance to antimicrobials (Ibáñez de Aldecoa et al. 2017, Karygianni et al. 2020). Previous work from our group showed that planktonic cultures and biofilms of *T. inkin* release nucleic acids to the extracellular medium (Cordeiro et al. 2015). Therefore, we hypothesize that eDNA might be an important

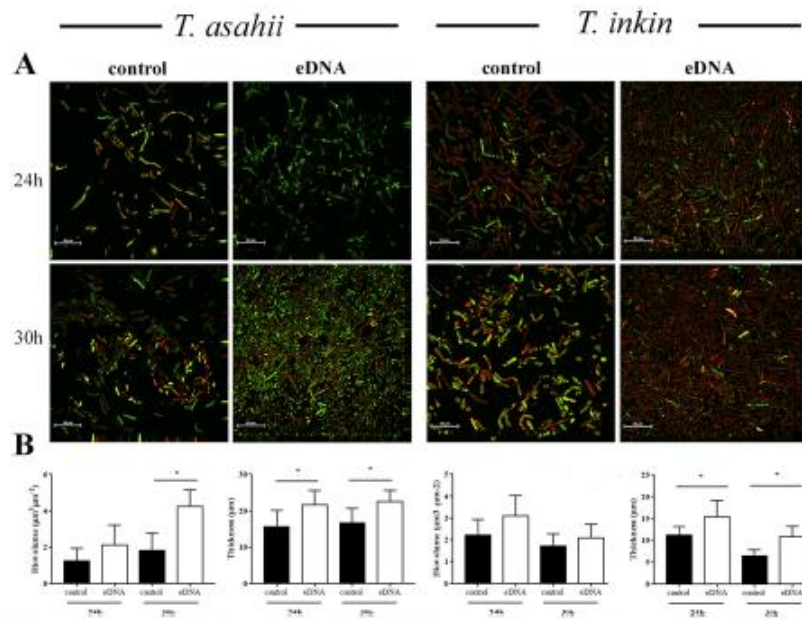


Figure 6. CLSM of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms treated with 160 ng/mL eDNA after 24 h and 30 h of development in RPMI medium (A). Effect of exogenous eDNA on biomass and thickness of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms (B). *Statistically significant differences ($p < 0.05$) when compared to growth control without eDNA.

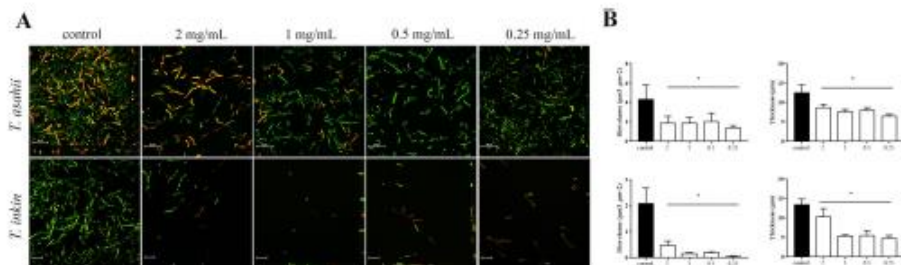


Figure 7. CLSM of mature *T. asahii* e *T. inkin* biofilms treated with different concentrations of DNase (A). Effect of DNase on biomass and thickness of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms (B). *Statistically significant differences ($p < 0.05$) when compared to growth control without DNase.

structural and functional component of *Trichosporon* biofilms.

For this, we first evaluate the release of eDNA during biofilm development. We found that the amount of eDNA in *T. asahii* and *T. inkin* biofilms increased phase dependently, and higher amounts of eDNA were detected in 24 h and 48 h biofilms. Previous studies have confirmed a similar

pattern in biofilms of *Aspergillus fumigatus* (Rajendran et al. 2013) and *Candida albicans* (Rajendran et al. 2014). The incipient amount of eDNA detected in ECM of *Trichosporon* biofilms may be a bias from the methodology employed in our study, and further experiments should be performed with techniques with higher sensitivity, such as quantitative PCR.

Earlier studies have proven that exogenous eDNA is able to enhance cell adhesion and biofilm formation in *C. albicans* (Martins et al. 2010), *A. fumigatus* (Shopova et al. 2013); *C. glabrata* and *C. tropicalis* (Sapaar et al. 2014). In the present study we showed that eDNA caused a similar effect on *Trichosporon* biofilms, although a regular pattern regarding eDNA concentration and biofilm stage could not be observed. Overall, exogenous eDNA increased biomass and thickness of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms.

Our data indicate that eDNA reduced the susceptibility of *Trichosporon* biofilms to amphotericin B and voriconazole. Similar results were found in other fungal pathogens (Shopova et al. 2013, Martins et al. 2010). It is believed that eDNA reduce the transport of antimicrobials through ECM; in bacteria, eDNA also chelates cations which, in turn, triggers an antimicrobial resistance response (Ibáñez de Aldecoa et al. 2017). Although the precise mechanism of antifungal resistance mediated by eDNA is unknown, we believe that antifungal molecules may not penetrate properly through the thicker biofilm induced by eDNA.

The copious effect induced by eDNA on *Trichosporon* biofilms was abrogated after DNase treatment, which in turn destabilized the biofilm architecture. Therefore, it is possible to infer that eDNA has a structural role on *Trichosporon* biofilms. As DNase did not interfere on cell viability (data not shown) we suppose the enzyme has a direct effect on ECM. DNase also increased susceptibility of *Trichosporon* biofilms to VRZ. In general, DNase reduce the biomass of fungal sessile communities (Rajedran et al. 2013; Shopova et al. 2013) and for that reason the enzyme is considered a potential chemotherapeutic strategy for the management of fungal infections mediated by biofilms (Okshevsky et al. 2015; Rajedran et al. 2013).

Recent studies have highlighted the interaction between eDNA and host immune cells during chronic infections mediated by biofilms. Analysis performed with an implant of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in a murine model and directly in samples of chronic-infected cystic fibrosis patients have led to the hypothesis that eDNA from the host forms a passive physical shield against cationic antibiotics and phagocytes (Alhede et al. 2020). eDNA of *C. albicans* biofilms might act as an effective chemotactic factor and is involved in the activation of neutrophil extracellular traps, increasing the inflammatory response (Smolarz et al. 2021). Our study showed that exogenous eDNA increased biomass and antifungal tolerance

of *Trichosporon* biofilms and thus is reasonable to suppose that, as described for other pathogens, eDNA derived from neutrophils and macrophages may influence the physiology of *Trichosporon* biofilms and, as a consequence, the physiopathology of invasive trichosporonosis.

Our study presented experimental evidences that heterologous eDNA contributes to the structure and antifungal tolerance of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms. We believe that eDNA from other sources where *Trichosporon* biofilms can be found, such as skin and gut microbiota, as well as eDNA from neutrophils, can also modulate *Trichosporon* biofilms. In addition, we described the potential of DNase as adjuvant in biofilm control, which may be especially important in *Trichosporon* infections related to medical implants.

Ethical statement

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.


Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil [430193/2018-1; 309464/2019-6].


ORCID

Ana Luiza Ribeiro Aguiar  <http://orcid.org/0000-0001-9587-8067>

Bruno Nascimento da Silva  <http://orcid.org/0000-0002-4103-9863>

Marcos Fábio Gadelha Rocha  <http://orcid.org/0000-0001-5482-1734>

José Júlio da Costa Sidrím  <http://orcid.org/0000-0003-0086-1612>

Rossana de Aguiar Cordeiro  <http://orcid.org/0000-0001-8386-2180>

References

- Alhede M, Alhede M, Qvortrup K, Kragh KN, Jensen PO, Stewart PS, Bjarnsholt T. 2020. The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections in vivo. *Pathog Dis.* 78:ftaa018. doi:10.1093/femspd/ftaa018
- Bongomin F, Otu A, Calisti G, Richardson MD, Barnard J, Venkateswaran R, Vergidis P. 2019. *Trichosporon japonicum* fungemia and ventricular assist device infection in

- an immunocompetent patient. *Open Forum Infect Dis.* 6: ofz343. doi:10.1093/ofid/ofz343
- Carvalho MHGF, Santos FB, Nosanchuk JD, Zancope-Oliveira RM, Almeida-Paes R. 2014. L-dihydroxyphenylalanine induces melanin production by members of the genus *Trichosporon*. *FEMS Yeast Res.* 14:988–991. doi:10.1111/1567-1364.12174
- Collins TJ. 2007. ImageJ for microscopy. *Biotechniques.* 43: S25–S30. doi:10.2144/000112517
- Cordeiro RA, Serpa R, Alexandre CFU, Marques FJF, Melo CVS, Franco JS, Evangelista AJF, Camargo ZP, Brilhante RSN, Rocha MFG, et al. 2015. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. *J Med Microbiol.* 64:1277–1286. doi:10.1099/jmm.0.000159
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Baarn (The Netherlands): Centraalbureau voor Schimmiskultures.
- Di Bonaventura G, Pompílio A, Picciani C, Iezzi M, D'Antonio D, Piccolomini R. 2006. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:3269–3276. doi:10.1128/AAC.00556-06
- Iturrieta-Gonzalez IA, Padovan ACB, Bizerra FC, Hahn RC, Colombo AL. 2014. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PLoS One.* 9:e109553. doi:10.1371/journal.pone.0109553
- Ibáñez de Aldecoa AL, Zafra O, González-Pastor JE. 2017. Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Front Microbiol.* 8:1390. doi:10.3389/fmicb.2017.01390
- Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG. 2013. Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol.* 57:467–475. doi:10.1111/lam.12134
- Karygianni I, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. 2020. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol.* 28:668–681. doi:10.1016/j.tim.2020.03.016
- Kurakado S, Chiba R, Sato C, Matsumoto Y, Sugita T. 2020. N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine, a zinc chelator, inhibits biofilm and hyphal formation in *Trichosporon asahii*. *BMC Res Notes.* 13:6. doi:10.1186/s13104-020-04990-x
- Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn S, Burne RA, Koo H, Brady LJ, Wen ZT. 2014. *Streptococcus mutans* Extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol.* 196:2355–2366. doi:10.1128/JB.01493-14
- Mariné M, Brown NA, Riaño-Pachón DM, Goldman GH. 2015. On and under the skin: emerging basidiomycetous yeast infections caused by *Trichosporon* species. *PLoS Pathog.* 11:e1004982–21. doi:10.1371/journal.ppat.1004982
- Martinez LR, Casadevall A. 2006. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilm to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:1021–1033. doi:10.1128/AAC.50.3.1021-1033.2006
- Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. 2012. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses.* 55:80–85. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x
- Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. 2010. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* 169: 323–331. doi:10.1007/s11046-009-9264-y
- Okshevsky M, Meyer RL. 2015. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 41: 341–352. doi:10.3109/1040841X.2013.841639
- Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL. 2015. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr Opin Biotechnol.* 33:73–80. doi:10.1016/j.copbio.2014.12.002
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* 72: 157–165. doi:10.1016/j.mimet.2007.11.010
- Ramírez I, Moncada D. 2020. Fatal Disseminated infection by *Trichosporon asahii* under voriconazole therapy in a patient with acute myeloid leukemia: a review of breakthrough infections by *Trichosporon* spp. *Mycopathologia.* 185:377–388. doi:10.1007/s11046-019-00416-w
- Rajendran R, Sherry L, Lappin DF, Nile CJ, Smith K, Williams C, Munro CA, Ramage G. 2014. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. *BMC Microbiol.* 14:303. doi:10.1186/s12866-014-0303-6
- Rajendran R, Williams C, Lappin DF, Millington O, Martins M, Ramage G. 2013. Extracellular DNA release acts as an antifungal resistance mechanism in mature *Aspergillus fumigatus* biofilms. *Eukaryot Cell.* 12:420–429. doi:10.1128/EC.00287-12
- Rodríguez-Tudela JL, Díaz-Guerra TM, Mellado E, Cano V, Tapia C, Perkins A, Gomez-Lopez A, Rodero L, Cuenca E. 2005. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 4026–4034. doi:10.1128/AAC.49.10.4026-4034.2005
- Sapaar B, Nur A, Hirota K, Yumoto H, Murakami K, Amoh T, Matsuo T, Idhikawa T, Miyake Y. 2014. Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. *J Appl Microbiol.* 116:1531–1542. doi:10.1111/jam.12483
- Shopova I, Bruns S, Thywissen A, Kniermeyer O, Brahdage AA, Hillmann F. 2013. Extrinsic extracellular DNA leads to biofilm formation and colocalizes with matrix polysaccharides in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 4:141. doi:10.3389/fmicb.2013.00141
- Smolarz M, Zawrotniak M, Satala D, Rapala-Kozik M. 2021. Extracellular nucleic acids present in the *Candida albicans* biofilm trigger the release of neutrophil extracellular traps. *Front Cell Infect Microbiol.* 11:681030. doi:10.3389/fcimb.2021.681030
- Sugimoto S, Sato F, Miyakawa R, Chiba A, Onodera S, Hori S, Mizunoe Y. 2018. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep.* 8:2254. doi:10.1038/s41598-018-20485-z
- Taverna CG, Córdoba S, Murisengo OA, Vivot W, Davel G, Bosco-Borgeat ME. 2014. Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. *Med Mycol.* 52:356–366. doi:10.1093/mmy/myt029