



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BIANCA DORANA DE OLIVEIRA SOUZA

**ANÁLISE *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
Arthrographis kalrae POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA E COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA ENTRE OS EXTRATOS DE
BIOFILME E DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS**

Londrina
2021

BIANCA DORANA DE OLIVEIRA SOUZA

**ANÁLISE *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
Arthrographis kalrae POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA E COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA ENTRE OS EXTRATOS DE
BIOFILME E DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano.

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S729a Souza, Bianca Dorana de Oliveira.

Análise *in vitro* da formação de biofilme por *Arthrographis kalrae* por microscopia eletrônica de varredura e comparação das atividades citotóxica e hemolítica entre os extratos de biofilme e de células planctônicas / Bianca Dorana de Oliveira Souza. - Londrina, 2021.
56 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Citotoxicidade - Tese. 2. Fatores de virulência - Tese. 3. Fungos - Tese. 4. Hemólise - Tese. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

BIANCA DORANA DE OLIVEIRA SOUZA

**ANÁLISE *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
Arthrographis kalrae POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA E COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA ENTRE OS EXTRATOS DE
BIOFILME E DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Fernanda Akemi Nakanishi-Ito
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de fevereiro de 2021.

*Dedico este trabalho ao meu
esposo Luiz Henrique Rodrigues
da Fonseca por todo o cuidado,
carinho e companheirismo*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho tão importante e por me dar força e coragem para superar cada desafio.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, a qual eu admiro por seu entusiasmo e determinação, agradeço por cada ensinamento, atenção, confiança e incentivo. Serei sempre grata por contribuir tanto para a minha formação acadêmica.

Ao Departamento de Ciências Patológicas e a todos os professores do curso de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL por todo incentivo e contribuição para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono e à Profa. Dra. Fernanda Akemi Nakanishi-Ito por aceitarem fazer parte da banca de defesa de dissertação de mestrado e contribuírem para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio financeiro durante o mestrado.

Agradeço aos colegas de laboratório, Janneth Josefina Escobar Arcos, Franciele Ayumi Semêncio Chiyoda-Rodini, Fernando Galdino Ricci, João Gabriel de Albuquerque Cavalcanti, Leticia Rodrigues Terkelli e Maria Catarina Cavalcanti Fracazzo por toda ajuda e momentos de descontração. Meu agradecimento especial à Janneth Josefina Escobar Arcos pela amizade e por me ensinar diversas técnicas.

Agradeço também ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura e à Profa. Dra. Danielle Lazarin Bidóia pelo auxílio com as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus pais, Jovino Rodrigues de Souza Neto e Marli Alves de Oliveira, todo o meu amor e gratidão. Vocês lutaram muito para que eu tivesse condições de chegar até aqui, sempre incentivaram e acreditaram em mim. Vocês são meu exemplo de resiliência. As minhas vitórias são suas também!

Agradeço a minha querida avó, Lourdes José da Silva Oliveira, por sempre acreditar em mim e me dizer tantas palavras de carinho e incentivo. Serei

sempre grata por suas orações ao meu favor.

Agradeço ao meu marido, Luiz Henrique Rodrigues da Fonseca, pelo companheirismo, compreensão e apoio durante os meus estudos. É o meu melhor amigo e meu porto seguro em momentos de aflição. Obrigada por tudo, meu amor!

Aos meus irmãos, Wilke Deleon Rodrigues de Souza, Milca Mizrain Avelino dos Santos, Lohaine de Oliveira Campos e Lohan de Oliveira Campos, por sempre torcerem por mim e me fazerem tão bem. Desejo a vocês o melhor nesta vida.

Serei sempre grata a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“O conhecido é finito, o desconhecido, infinito;
intelectualmente permanecemos em uma ilha
dentro de um oceano ilimitado de inexplicabilidade.
Nosso objetivo em todas as gerações é reivindicar
por um pouco mais de terra.”*

- T. H. Huxley, 1887

SOUZA, Bianca Dorana de Oliveira. **Análise *in vitro* da formação de biofilme por *Arthrographis kalrae* por microscopia eletrônica de varredura e comparação das atividades citotóxica e hemolítica entre os extratos de biofilme e de células planctônicas.** 2021. 56 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Arthrographis kalrae é um fungo termodimórfico envolvido em diversas doenças em humanos, como ceratite, infecção pulmonar, sinusite, onicomicose, artrite, endocardite, meningite e acidente vascular cerebral. Estudos sobre a patogenicidade e fatores de virulência de *A. kalrae* são escassos, comprometendo o diagnóstico e o tratamento dos pacientes. Sabe-se que *A. kalrae* causa síndrome neurológica em camundongos e que apresenta atividade proteolítica, hemolítica e citotóxica, sendo que estas atividades podem representar importantes fatores de virulência deste patógeno. Biofilmes são comunidades microbianas fixadas a uma superfície que produzem matriz extracelular (ECM) própria. A formação de biofilme confere aos microrganismos um importante fator de virulência, pois os biofilmes são altamente resistentes aos antimicrobianos e às defesas do hospedeiro. Diversos biofilmes fúngicos têm sido investigados, como os biofilmes de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., porém, até o momento, a formação de biofilme por *A. kalrae* não havia sido demonstrada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi demonstrar a formação de biofilme por *A. kalrae* e analisar as suas atividades citotóxica e hemolítica. O ensaio de biofilme foi feito em placas de poliestireno em diferentes tempos de incubação (4, 12, 24, 36, e 48 h) e a biomassa total do biofilme foi examinada por coloração de cristal violeta. Biofilmes de *A. kalrae* crescidos por 24 e 48h em poliestireno e em lamínulas de vidro foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. Extratos totais de células planctônicas e de biofilme de *A. kalrae* foram analisados em ensaios de citotoxicidade (com linhagens celulares RAW 264.7 e JURKAT) e de atividade hemolítica (com hemácias de carneiro). *A. kalrae* formou biofilme em 24-48h com forte agregação de fungos e com área densa de ECM, principalmente em 48h. Os extratos totais de células planctônicas e de biofilme de *A. kalrae* apresentaram atividade citotóxica em células JURKAT. Nestas células, o extrato total de biofilme de *A. kalrae* apresentou maior atividade citotóxica em relação ao extrato total de células planctônicas ($p < 0,0001$). Em células RAW 264.7, apenas o extrato total de biofilme de *A. kalrae* apresentou atividade citotóxica. O extrato total de células planctônicas de *A. kalrae* apresentou maior atividade hemolítica em relação ao extrato total de biofilme. Este estudo demonstrou pela primeira vez que *A. kalrae* apresenta capacidade de formar biofilme *in vitro*, que o biofilme apresenta atividades citotóxica e hemolítica e que o fator citotóxico é mais frequente nesta forma.

Palavras-chave: citotoxicidade; fatores de virulência; fungos; hemólise.

SOUZA, Bianca Dorana de Oliveira. ***In vitro* analysis of biofilm formation by *Arthrographis kalrae* by scanning electron microscopy and comparison of cytotoxic and hemolytic activities between biofilm and planktonic cell extracts.** 2021. 56 f. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Arthrographis kalrae is a thermodimorphic fungus involved in several diseases in humans, such as keratitis, lung infection, sinusitis, onychomycosis, arthritis, endocarditis, meningitis and stroke. Studies on the pathogenicity and virulence factors of *A. kalrae* are scarce, compromising the diagnosis and treatment of patients. It is known that *A. kalrae* causes neurological syndrome in mice and that it has proteolytic, hemolytic and cytotoxic activity, and these activities may represent important virulence factors of this pathogen. Biofilms are microbial communities attached to a surface that produce their own extracellular matrix (ECM). The formation of biofilm gives microorganisms an important virulence factor, as biofilms are highly resistant to antimicrobials and host defenses. Several fungal biofilms have been investigated, such as the biofilms of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp., however, until now the formation of biofilm by *A. kalrae* had not been demonstrated. Therefore, the objective of this work was to demonstrate the biofilm formation by *A. kalrae* and to analyze its cytotoxic and hemolytic activities. The biofilm assay was performed on polystyrene plates at different incubation times (4, 12, 24, 36, and 48 h) and the total biofilm biomass was examined by crystal violet staining. *A. kalrae* biofilms grown for 24 and 48 hours in polystyrene and glass coverslips were analyzed by scanning electron microscopy. Total extracts of planktonic cells and biofilm from *A. kalrae* were analyzed in cytotoxicity assays (with RAW 264.7 and JURKAT cell lines) and hemolytic activity (with sheep red blood cells). *A. kalrae* formed biofilm in 24-48h with strong fungi aggregation and with dense area of ECM mainly in 48h. The total extracts of planktonic cells and biofilm from *A. kalrae* showed cytotoxic activity in JURKAT cells. In these cells, the biofilm total extract of *A. kalrae* showed greater cytotoxic activity in relation to the planktonic total extract ($p < 0.0001$). In RAW 264.7 cells, only the biofilm total extract of *A. kalrae* showed cytotoxic activity. The planktonic total extract of *A. kalrae* showed greater hemolytic activity in relation to the biofilm total extract. This study demonstrated for the first time that *A. kalrae* has the capacity to form biofilm *in vitro*, that biofilm has cytotoxic and hemolytic activities and that the cytotoxic factor is more frequent in this form.

Keywords: cytotoxicity; fungi; hemolysis; virulence factors.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – *A. kalrae* IFM55165 crescido por 7 dias a 36 °C em ágar Sabouraud Dextrose 4%. À esquerda, aspecto macroscópico das colônias de *A. kalrae*. À direita, aspecto microscópico das células de *A. kalrae* coradas com solução de azul de lactofenol, aumento de 1000x. **Fonte:** o próprio autor17
- Figura 2** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *A. fumigatus* (à esquerda) e de *C. albicans* (à direita) evidenciando a ECM. **Fonte:** Fanning e Mitchell (2012).27

ARTIGO

- Figure 1** – Kinetics of biofilm formation by *A. kalrae* on polystyrene microplates determined by crystal violet staining. The values expressed in O. D. represent the average of two independent experiments. The letters indicate statistical difference between all analyzed times ($p < 0.0001$) ...40
- Figure 2** – Scanning electron microscopy of *A. kalrae* biofilm grown for 24 hours, *in vitro*. The green arrows point to the extracellular matrix. A - C: *A. kalrae* biofilm grown on polystyrene. D - F: *A. kalrae* biofilm grown on glass coverslips. Magnification: 1000x (A, D), 5000x (B, E), 25000x (C, F)42
- Figure 3** – Scanning electron microscopy of the biofilm of *A. kalrae* grown for 48 hours, *in vitro*. The green arrows point to the extracellular matrix. A - C: *A. kalrae* biofilm grown on polystyrene. D - F: *A. kalrae* biofilm grown on glass coverslips. Magnification: 1000x (A, D), 5000x (B, E), 25000x (C, F). The red arrow points to the strong cohesion between hyphae (C).....43
- Figure 4** – Viability of RAW 264.7 cells treated with total extract of *A. kalrae* planktonic and biofilm cells. The letters indicate statistical difference in relation to the control and the asterisks indicate statistical difference between the groups ($p < 0.0001$).44
- Figure 5** – Viability of JURKAT cells treated with total extract of *A. kalrae* planktonic and biofilm cells. The letters indicate statistical difference

in relation to the control and the asterisks indicate statistical difference between the groups ($p < 0.05$).....45

Figure 6 – Hemolysis assay with total extract of *A. kalrae* planktonic and biofilm. Samples: pure and diluted 1/2, 1/4, 1/8, and 1/16, in duplicate. A: Percentage of hemolysis. B: Hemolysis assay; C-: negative control (PBS); C+: positive control (distilled water).46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

~	Aproximadamente
µg	Microgramas
µL	Microlitros
ACE2	<i>Cell Wall Transcription Factor</i> (Fator de Transcrição de Parede Celular)
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
Als	<i>Agglutinin-like sequence</i> (Sequência semelhante a aglutinina)
ALS1	<i>Agglutinin-like protein 1</i> (Proteína tipo Aglutinina 1)
ALS3	<i>Agglutinin-like protein 3</i> (Proteína tipo Aglutinina 3)
BCR1	<i>Biofilm and cell wall regulator 1</i> (Regulador de Biofilme e de Parede Celular)
CatB	Catalase B
CFA	<i>Cell-free Antigen</i> (Antígeno livre de célula)
CHT2	<i>Chitinase 2 precursor</i> (Precursor de Quitinase 2)
CHT3	<i>Chitinase 3 precursor</i> (Precursor de Quitinase 3)
CSA1	<i>Cell wall protein 1 precursor</i> (Precursor de Proteína 1 de Parede celular)
CSH1	<i>Csh1p Protein</i> (Proteína Csh1p)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DPPV	Dipeptidilpeptidase V
EAP1	Adesina de Parede Celular
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (Matriz Extracelular)
eDNA	<i>Extracellular Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico Extracelular)

EFG1	<i>Enhanced Filamentous Growth Protein 1</i> (Proteína 1 de Crescimento Filamentoso Aprimorado)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro Bovino Fetal)
GAG	Galactosaminogalactan
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
° C	Graus Celsius
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodalton
LASIK	<i>Laser-Assisted in Situ Keratomileusis</i> (Ceratomileuse por Excimer Laser)
MGCx	<i>Mannan-glucan Complex</i> (Complexo de Manana-glucana)
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattracting Protein 1</i> (Proteína Quimioatraente de Monócitos 1)
MIP1 β	<i>Macrophages Inflammatory Protein 1β</i> (Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 β)
mm	Milímetros
MP65	<i>Cell surface mannoprotein 65</i> (Manoproteína de Superfície Celular 65)
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i> (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos)
nm	Nanômetros
O. D.	<i>Optical Density</i> (Densidade ótica)
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células Mononucleares de Sangue Periférico)
PBS	<i>Phosphate-saline Buffer</i> (Tampão Fosfato-salino)

PGA10	<i>GPI-anchored Hemophore PGA10</i> (Hemóforo PGA10 Ancorado em GPI)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHO100	Proteína PHO100
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i> (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil, inibidor de protease)
RBT4	Proteína Secretada RBT4
RodA	Hidrofobina RodA
RodB	Hidrofobina RodB
RodD	Hidrofobina RodD
RT	<i>Room Temperature</i> (Temperatura Ambiente)
SAP9	Candidapepsin-9
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio)
SRBC	<i>Sheep Red Blood Cells</i> (Glóbulos Vermelhos de Ovelha)
SUN41	<i>Secreted Beta-glucosidase SUN41</i> (Beta-glucosidase Secretada SUN41)
Th2	<i>T helper 2</i> (Células T auxiliares tipo 2)
TMB	<i>3'3'5'5-tetramethylbenzidine</i> (3'3'5'5-tetrametilbenzidina)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i> (Fator de Necrose Tumoral α)
TE	<i>Total Extract</i> (Extrato Total)
YWP1	<i>Yeast-form Wall Protein 1</i> (Proteína 1 de Parede em Forma de Levedura)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	<i>ARTHROGRAPHIS KALRAE</i>	16
2.1.1	Patogenicidade e Fatores de Virulência de <i>A. kalrae</i>	17
2.1.2	Relatos de Casos Envolvendo <i>A. kalrae</i>	20
2.2	BIOFILMES.....	24
2.2.1	Biofilmes Fúngicos	25
2.2.2	Biofilmes Fúngicos e Resposta Imune do Hospedeiro	27
	REFERÊNCIAS	29
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	ARTIGO: <i>IN VITRO</i> <i>Arthrographis kalrae</i> BIOFILM FORMATION: SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, CYTOTOXIC AND HEMOLYTIC ACTIVITIES	35
4.1	INTRODUCTION	36
4.2	MATERIALS AND METHODS	37
4.2.1	Microorganism and Cell Lines	37
4.2.2	<i>A. kalrae</i> Biofilm Formation	37
4.2.3	<i>A. kalrae</i> Total Biofilm Biomass.....	38
4.2.4	Scanning Electron Microscopy (SEM)	38
4.2.5	Total Extract of <i>A. kalrae</i>	38
4.2.6	Cytotoxicity Assay	39
4.2.7	Hemolysis Assay	39
4.2.8	Statistical Analysis.....	39
4.3	RESULTS.....	40
4.3.1	<i>A. Kalrae</i> Total Biofilm Biomass	40
4.3.2	<i>A. kalrae</i> Biofilm (SEM)	41

4.3.3	Cytotoxicity of Planktonic and Biofilm Total Extract on RAW 264.7 Cells	44
4.3.4	Cytotoxicity of Planktonic and Biofilm Total Extract on JURKAT Cells	44
4.3.5	Hemolysis Assay	45
4.4	DISCUSSION	46
	REFERENCES	49
	CONCLUSÕES GERAIS	52

1 INTRODUÇÃO

Arthrographis kalrae é um fungo termodimórfico envolvido em diversas doenças em humanos. Foram relatados casos de ceratite (PERLMAN; BINNS, 1997; TING et al., 2020), infecção pulmonar (VOS et al., 2012; CAMPOVERDE ESPINOZA et al., 2017), sinusite (PONIKAU et al., 1999), onicomicose (SUGIURA; HIRONAGA, 2010), eumicetoma (DEGAVRE et al., 1997), artrite (SAINAGHI et al., 2015), endocardite (DE DIEGO CANDELA et al., 2010), meningite (CHIN-HONG et al., 2001) e acidente vascular cerebral (PICHON et al., 2008).

A. kalrae pode ser isolado do solo e isto sugere que os indivíduos podem ser infectados pelo contato com o solo (SUGIURA; HIRONAGA, 2010). Porém, até o momento não se sabe como a infecção por este fungo é adquirida.

Estudos sobre a patogenicidade e fatores de virulência de *A. kalrae* são escassos, comprometendo o diagnóstico e o tratamento dos pacientes. Até o momento, sabe-se que *A. kalrae* causa síndrome neurológica em camundongos, causando hiperirritabilidade, saltos, giros e ataxia e que modula a resposta imune para o padrão Th2 (TEWARI; MACPHERSON, 1968; NAGASHIMA et al., 2016). Além disso, este fungo apresenta atividades proteolítica (CINO; TEWARI, 1976), hemolítica e citotóxica (NAGASHIMA et al., 2014), que podem representar importantes fatores de virulência deste patógeno.

Neste trabalho, demonstramos uma importante característica de *A. kalrae* que é a capacidade de formar biofilme. Biofilmes são comunidades microbianas fixadas a uma superfície biótica ou abiótica que produzem matriz extracelular própria e são fenotipicamente diferentes das células planctônicas (em suspensão) (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014). Esta característica confere aos microrganismos um importante fator de virulência, pois os biofilmes são altamente resistentes aos antimicrobianos e às defesas do hospedeiro. Os biofilmes podem crescer em dispositivos implantados nos pacientes, como cateteres, ou em mucosas (DAROUICHE, 2001; LAGREE; MITCHELL, 2017).

Diversos biofilmes fúngicos têm sido investigados, como os biofilmes de *Candida* spp. (KOJIC; DAROUICHE, 2004; RAMAGE et al., 2001), *Aspergillus* spp. (BEAUVAIS et al., 2007; RAMAGE et al., 2011) e *Cryptococcus neoformans* (ASLANYAN et al., 2017), porém, até o momento, a formação de biofilme por *A. kalrae*

não havia sido demonstrada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi demonstrar a formação de biofilme por *A. kalrae* e também analisar os extratos de células planctônicas e de biofilme quanto as atividades citotóxica e hemolítica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *ARTHROGRAPHIS KALRAE*

Arthrographis kalrae é uma espécie de fungo descrita primeiramente em 1939 por Cochet como *Arthrographis langeroni* e por Tewari e Macpherson (1971) como *Oidiodendron kalrai*. Posteriormente, Sigler e Carmichael (1983) juntaram as duas espécies e as reclassificaram como *Arthrographis kalrae* (SIGLER; CARMICHAEL, 1983; TEWARI; MACPHERSON, 1971). Este fungo pertence ao filo Ascomycota, classe Euascomicetos, ordem Eurotiales e família Eremomycetaceae (SIGLER; CARMICHAEL, 1983). Além da espécie *A. kalrae*, o gênero *Arthrographis* possui três outras espécies, *A. alba*, *A. lignicola* e *A. pinicola* (SIGLER; CARMICHAEL, 1983).

Tewari e Macpherson (1971) descreveram as características morfológicas de *A. kalrae* isolado de escarro de um paciente com uma doença respiratória mal definida na Índia em 1961. Segundo esta descrição, *A. kalrae* é um fungo termodimórfico que a 25 °C se apresenta na fase filamentosa/micelial e a 37°C se apresenta na fase de levedura. Na fase filamentosa, seu crescimento é lento (as colônias atingem 5 cm de diâmetro em 4 semanas), as colônias são brancas e granulares com pigmento castanho amarelado, as hifas são ramificadas, septadas e incolores, os artroconídeos são ovais a redondos e surgem na extremidade de um conidióforo ramificado ou não ramificado. Na fase de levedura, o fungo apresenta crescimento rápido (24 horas) e se espalha na superfície assumindo aparência enrugada em 7 dias. As colônias em fase de levedura são redondas e elevadas. Microscopicamente, as leveduras apresentam morfologia oval a alongada e poucos artroconídeos ovais a retangulares. Com o envelhecimento da cultura há aumento de artroconídeos, o que foi associado ao aparecimento de rugas na superfície.

A. kalrae também pode ser isolado de animais. A figura 1 mostra o isolado de *A. kalrae* IFM 55165 cedido pelo Centro de Pesquisa de Fungos Patogênicos e Toxicoses Microbianas da Universidade de Chiba, Japão, proveniente de lesão cutânea de gato, utilizado no presente estudo.

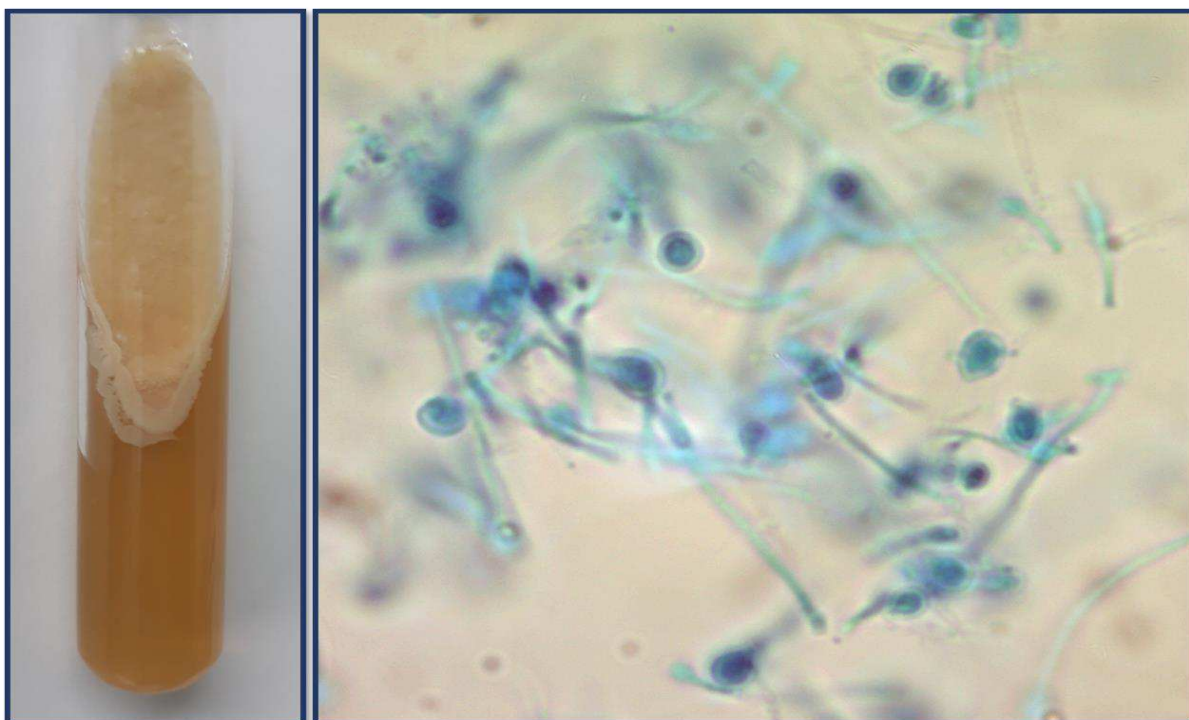


Figura 1. *A. kalrae* IFM55165 crescido por 7 dias a 36 °C em ágar Sabouraud Dextrose 4%. À esquerda, aspecto macroscópico das colônias de *A. kalrae*. À direita, aspecto microscópico das células de *A. kalrae* coradas com solução de azul de lactofenol, aumento de 1000x. **Fonte:** o próprio autor.

2.1.1 Patogenicidade e Fatores de Virulência de *A. kalrae*

Existem poucos estudos sobre infecção experimental com *A. kalrae*. O primeiro estudo foi realizado por Tewari e Macpherson (1968) demonstrando a patogenicidade e os efeitos neurológicos de *A. kalrae* em camundongos. O estudo mostrou que a infecção por via intravenosa produz efeitos mais graves do que a infecção por via intraperitoneal. Os camundongos apresentaram síndrome neurológica com manifestações de hiperirritabilidade, saltos, giros e ataxia, sendo que estas manifestações foram seguidas de morte ou aparente recuperação quando os camundongos foram infectados por via intravenosa e foram seguidas de aparente recuperação quando infectados por via intraperitoneal. Além disso, *A. kalrae* foi isolado de órgãos como baço, rim, fígado, pulmão e cérebro. Foram identificados focos de necrose, infiltrado inflamatório e elementos fúngicos como artrósporos e blastósporos, principalmente na medula renal. No cérebro dos camundongos havia

focos de meningite, leve congestão dos vasos sanguíneos, encefalite e gliose. Poucos microrganismos foram encontrados nos pulmões, fígado e baço, mostrando que estes órgãos provavelmente não apresentam condições favoráveis à proliferação de *A. kalrae*. Swenberg e Koestner e Tewari (1969) demonstraram com um modelo de encefalite micótica experimental que a forma micelial de *A. kalrae* é a sua forma invasiva.

Estudos mostram que há reação cruzada entre *Histoplasma capsulatum* e *A. kalrae*. Nestes estudos, cobaias (porquinhos-da-índia) infectadas com leveduras destes fungos passaram por um teste cutâneo de reatividade cruzada após 6 e 12 semanas de infecção com antígenos homólogos e heterólogos, tanto da fase micelial quanto leveduriforme (TEWARI; MACPHERSON; MAITRA, 1969). Houve reação cruzada entre antígenos homólogos e heterólogos após 12 semanas. A reação aos antígenos da fase leveduriforme foi mais pronunciada e mais persistente do que a reação aos antígenos da fase micelial. Os soros de animais imunizados com *A. kalrae* reagiram apenas com antígeno homólogo, mas os soros de animais imunizados com *H. capsulatum* reagiram com antígenos de *A. kalrae*. Estes resultados sugerem que há compartilhamento de antígenos entre as espécies estudadas (TEWARI; MACPHERSON; MAITRA, 1969).

Outro estudo mostrou que há proteção cruzada entre *H. capsulatum* e *A. kalrae*. Neste estudo, foi observada a mortalidade de camundongos imunizados e não imunizados após infecção com *H. capsulatum*. Os animais do grupo controle não imunizados apresentaram mortalidade de 85% em 30 dias, o grupo imunizado com *A. kalrae* vivo não apresentou nenhuma proteção com 100% de mortalidade e o grupo imunizado com células formalizadas de *A. kalrae* apresentou significativa proteção com mortalidade de 45%. Os autores discutiram duas possibilidades para explicar a não ocorrência de proteção na imunização com *A. kalrae* vivo: ou a dose imunizante de *A. kalrae* vivo foi insuficiente para produzir anticorpos e/ou infecção ou a baixa dose causou produção de anticorpos e infecção de baixo grau e aumentou a suscetibilidade dos camundongos ao *H. capsulatum* (TEWARI; MACPHERSON, 1969).

Ainda para investigar a reação cruzada entre *A. kalrae* e outras espécies de fungos, foi realizado um estudo que mostrou forte reatividade de soros de camundongos infectados com *A. kalrae* com células de *Paracoccidioides* sp. e *Coccidioides posadasii* por imuno-histoquímica, mas não houve reação com células

de *H. capsulatum*. Entretanto, soros de camundongos infectados com alguns isolados de *H. capsulatum* reagiram com células de *A. kalrae* (SHUMOTO et al., 2019). Além disso, neste mesmo estudo, foi possível analisar a patogenicidade de dois isolados de *A. kalrae*, o isolado de escarro de um paciente com uma doença respiratória mal definida (IFM 52641) e o isolado proveniente de lesão cutânea de gato (IFM 55165). Camundongos infectados com o isolado IFM 52641 não apresentaram elementos fúngicos em seus tecidos, mas havia focos inflamatórios no cérebro, fígado e rim. Por outro lado, camundongos infectados com o isolado IFM 55165 apresentaram diversas alterações histopatológicas como, encefalite neutrofílica difusa, focos de leucócitos polimorfonucleares nos sinusoides hepáticos, abundância de leucócitos polimorfonucleares ao redor do glomérulo e túbulos renais e presença de massas fúngicas filamentosas nos rins (SHUMOTO et al., 2019).

Um estudo realizado por Nagashima et al. (2016) também mostrou que camundongos infectados com *A. kalrae* apresentam síndrome neurológica. Neste estudo, foi observado que os camundongos infectados com o fungo apresentaram perda de peso, diminuição da carga fúngica e aumento de IgG durante o período de infecção experimental. Além disso, o estudo da resposta imune celular a *A. kalrae* no decorrer da infecção murina com quantificação dos níveis de citocinas no soro e em homogenato de cérebro de camundongos, sugere que *A. kalrae* induz imunomodulação sistêmica para resposta Th2.

Em relação aos fatores de virulência de *A. kalrae*, os estudos também são escassos. O estudo das características bioquímicas deste fungo revelou que há ausência de fermentação, há hidrólise de ureia e uma forte atividade caseinolítica (TEWARI; MACPHERSON, 1971). Cino e Tewari (1975) estudaram as características físico-químicas das enzimas proteolíticas de *A. kalrae* e mostraram que extratos livres de células (pH 5,8 – 6,0) hidrolisam hemoglobina, lactalbumina, gelatina, elastina, colágeno e membrana basal renal de coelho. Este estudo sugere que a atividade proteolítica pode ser importante no processo de infecção por *A. kalrae*.

Houve também demonstração da atividade de frações enzimáticas obtidas através de cromatografia de troca iônica. Os dados indicaram que as leveduras de *A. kalrae* produzem um complexo de pelo menos 6 enzimas proteolíticas. Três proteínas precipitadas com sulfato de amônio a 100% de saturação hidrolisaram caseína, gelatina, elastina e colágeno. Três proteínas precipitadas com sulfato de amônio a 60% de saturação hidrolisaram caseína e colágeno (CINO; TEWARI, 1976).

Nagashima et al. (2014) demonstraram que antígenos solúveis de *A. kalrae* apresentam atividades hemolítica e citotóxica. Uma maior atividade hemolítica destes antígenos solúveis foi observada em frações de alta massa molecular (> 150 kDa) e uma maior citotoxicidade foi observada em frações de baixa massa molecular. Estas atividades hemolíticas e citotóxicas podem representar importantes fatores de virulência de *A. kalrae*.

2.1.2 Relatos de Casos Envolvendo *A. kalrae*

Existem relatos de diversas doenças em humanos envolvendo *A. kalrae* e o número de tais relatos vem crescendo ao longo dos anos. Até o momento, foram relatados 6 casos de ceratite fúngica, 4 casos de infecção pulmonar, 3 casos de onicomicose, 3 casos de sinusite, 2 casos de eumicetoma, 2 casos de artrite, 1 caso de meningite, 1 caso de panoftalmite, 1 caso de acidente vascular cerebral e vasculite cerebral e 1 caso de endocardite.

Dentre as manifestações clínicas envolvendo *A. kalrae*, a ceratite, que é a inflamação da camada mais externa dos olhos (córnea), é a mais relatada até o momento. O primeiro caso relatado ocorreu em uma mulher saudável de 49 anos que usava lentes de contato e que foi encaminhada ao oftalmologista devido a uma intensa fotofobia. A manifestação clínica se assemelhava a uma infecção por *Acanthamoeba*, mas nenhuma evidência deste microrganismo foi encontrada. A fotofobia e a dor foram ficando mais graves, pois a medicação indicada anteriormente não fez efeito. Elementos fúngicos foram encontrados através de um esfregaço e a paciente lembrou que trabalhou em seu jardim sem lentes de contato dois dias antes do início da fotofobia. A paciente foi tratada com anfotericina e cetoconazol e apresentou melhora. *A. kalrae* foi identificado como causador da ceratite (PERLMAN; BINNS, 1997).

Em um outro caso de ceratite causado por *A. kalrae* semelhante à infecção causada por *Acanthamoeba*, uma mulher de 23 anos de idade que usava lentes de contato, apresentou fotofobia e dor. A cultura revelou uma espécie de fungo e então se iniciou tratamento com anfotericina, o que levou a resolução da ceratite. A cultura mostrou que o microrganismo infeccioso era *A. kalrae* (BISER et al., 2004). E em mais um caso de ceratite foi relatado o uso de lentes de contato pela paciente, que tinha 42 anos de idade e necessitou de repetidas ceratoplastias devido a uma úlcera

de córnea causada por *A. kalrae* (THOMAS et al., 2011).

Outro caso de ceratite foi relatado em paciente com histórico de diabetes mellitus. O paciente de 52 anos de idade apresentou dor ocular por uma semana após lesão de corpo estranho. Foi feito um diagnóstico de ceratite infecciosa e foram prescritos antifúngicos sistêmicos e tópicos e antibióticos. Através da cultura dos isolados, *A. kalrae* foi identificado, mas apesar do tratamento sistêmico e cirúrgico o paciente perdeu a visão do olho afetado (RAMLI et al., 2013).

Recentemente, mais dois casos de ceratite causada por *A. kalrae* foram descritos. Em um dos casos, a ceratite ocorreu após ceratomileuse por excimer laser (LASIK), uma cirurgia refrativa. Uma mulher imunocompetente de 38 anos queixou-se de diminuição da visão, dor ocular e fotofobia dois meses após LASIK bilateral. *A. kalrae* foi identificado em culturas de raspagem de córnea e a paciente foi tratada com voriconazol, sem melhoras. O tratamento com natamicina tópica levou a uma melhora, mas a paciente apresentou recidiva da ceratite e um tratamento prolongado com natamicina tópica e voriconazol sistêmico foi administrado levando a melhora da paciente (FERNÁNDEZ-BARRIENTOS et al., 2020). Em outro caso, a ceratite por *A. kalrae* foi complicada por endoftalmite. O paciente de 65 anos apresentou uma úlcera de córnea infiltrativa e foi tratado com antifúngico tópico, intraestromal, intracamerar e sistêmico, além de três ceratoplastias. O paciente apresentava histórico de linfoma de células B e ceratopatia neurotrófica relacionada ao vírus herpes simplex, por isso o tratamento apenas com antifúngico não foi eficaz sendo necessário outros procedimentos terapêuticos (TING et al., 2020).

Foram relatados três casos de onicomicose causadas por *A. kalrae* (VOLLEKOVÁ; LISALOVÁ; POCZOVÁ, 2008; SUGIURA; HIRONAGA, 2010). Em um dos casos descritos, o paciente tinha 63 anos de idade, suas unhas estavam distróficas e através de cultura do isolado, *A. kalrae* foi identificado. O paciente foi tratado com terbinafina oral e miconazol tópico que proporcionaram cura completa das lesões. O isolamento deste fungo do jardim da casa do paciente sugere que ali seja o local onde a infecção pode ter sido adquirida (SUGIURA; HIRONAGA, 2010).

Um estudo indicou *A. kalrae* como causador de sinusite fúngica alérgica em pacientes com rinosinusite crônica (PONIKAU et al., 1999) e um caso de sinusite fúngica invasiva e meningite causadas por *A. kalrae* em um paciente com AIDS foi relatado. O paciente foi tratado com itraconazol, mas infelizmente foi a óbito em decorrência de sepse enterocócica e pneumonia por *Pneumocystis carinii* (CHIN-

HONG et al., 2001).

Também houve um relato de panoftalmite (infecção do olho inteiro, inflamação purulenta de todas as camadas do olho) e sinusite maxilar e etmoidal invasiva causadas por *A. kalrae*. O paciente era um agricultor de 39 anos que foi ferido no olho enquanto trabalhava nos campos. A ferida foi suturada, mas os sintomas pioraram e o paciente começou um tratamento com antibióticos, que não fez efeito. O material purulento da órbita ocular foi utilizado para culturas e o organismo identificado foi *A. kalrae*. O paciente começou um tratamento com antifúngicos, melhorou por alguns dias, mas infelizmente a infecção era muito extensa e ele teve o olho removido cirurgicamente (XI et al., 2004).

Um caso de eumicetoma causado por *A. kalrae* foi relatado em um paciente de 80 anos internado com pneumonia causada por *Pseudomonas aeruginosa*. O eumicetoma (tumor eritematoso, endurecido e indolor) apareceu na mão esquerda do paciente e o exame histopatológico da amostra de biópsia revelou grãos micóticos dentro do granuloma polimorfo na derme. *A. kalrae* foi isolado e identificado. O paciente foi tratado com itraconazol e a cura foi obtida depois de 4 meses. Este foi o primeiro caso relatado de eumicetoma causado por *A. kalrae* e o uso de corticosteroides sistêmicos pelo paciente devido a pneumonia pode ter contribuído para o desenvolvimento do eumicetoma, pois estes são mais comuns em imunocomprometidos (DEGAVRE et al., 1997).

A. kalrae também causou infecção da articulação do joelho e, neste caso, o paciente foi diagnosticado com eumicetoma e artrite micótica. Um homem de 33 anos de idade sofreu uma lesão penetrante no joelho e teve dor e inchaço progressivo no local. *A. kalrae* foi identificado com base em sua morfologia e análise molecular e apesar do tratamento com fluconazol, voriconazol, anfotericina, posaconazol e terbinafina, o joelho continuava inflamado. O paciente precisou passar por cirurgia para substituição total do joelho (artroplastia total) e ainda assim amostras do joelho eram positivas para *A. kalrae*. Depois de novo tratamento com anfotericina seguida de combinação com posaconazol e terbinafina não havia mais sinal de inflamação no joelho e com dois anos de acompanhamento houve recuperação total (BOAN et al., 2012; ONG et al., 2015).

Um paciente de 68 anos de idade com histórico de diabetes mellitus apresentou artrite séptica causada por *A. kalrae*. Ele havia sofrido várias lesões perfurantes na perna e teve episódios de edema, febre e dor no joelho. O paciente

iniciou tratamento com voriconazol com duração de 6 meses e não apresentou recidiva (SAINAGHI et al., 2015).

Um caso de acidente vascular cerebral e vasculite cerebral causados por *A. kalrae* em um paciente imunocompetente foi relatado. Um homem de 39 anos, criador de gado, apresentou sinusite aguda e infecção hepática por *Streptococcus pneumoniae*, foi tratado com antibiótico e apresentou melhora. Porém, depois de alguns dias, o paciente exibiu hemiplegia esquerda completa e os exames confirmaram acidente vascular cerebral direito e sinusite frontal direita. Infelizmente, depois de alguns dias o paciente teve morte encefálica confirmada e *A. kalrae* foi identificado como agente causal através de cultura do isolado, análise molecular e autópsia (PICHON et al., 2008).

Um caso de endocardite causado por *A. kalrae* foi descrito. Uma mulher de 50 anos foi submetida a uma cirurgia de fechamento de uma comunicação interatrial e 9 anos mais tarde ela apresentou embolia sistêmica. Os exames mostraram uma lesão grave na valva aórtica que foi substituída por uma prótese mecânica. *A. kalrae* foi identificado como agente causal e a paciente foi submetida a um tratamento antifúngico. Dentro de alguns meses a paciente apresentou um grande aneurisma na aorta ascendente, passou novamente por cirurgia e a análise da aorta foi novamente positiva para *A. kalrae*. A paciente passou novamente por tratamento antifúngico, mas um ano depois precisou passar por outros procedimentos cirúrgicos devido a recorrência da infecção por *A. kalrae* e foi a óbito na sala de cirurgia (DE DIEGO CANDELA et al., 2010).

A. kalrae também já causou infecção pulmonar em pacientes com doenças pré-existentes. Um homem de 61 anos com histórico de linfoma de Hodgkin do estágio IIA apresentou infecção pulmonar por *A. kalrae*, foi tratado com itraconazol, foi curado e não houve intercorrências (VOS et al., 2012).

A. kalrae estava entre as espécies que foram regularmente isoladas do pulmão de uma jovem de 19 anos com fibrose cística e colonização pulmonar bacteriana e fúngica. A paciente passou por transplante pulmonar bilateral e após o transplante, ela estava em choque séptico e então recebeu tratamento antibiótico e antifúngico. Depois de alguns dias, as amostras pulmonares estavam negativas, houve resolução da infecção fúngica, mas, apesar disso, a paciente faleceu 8 meses após o transplante por causa de um choque séptico bacteriano (DENIS et al., 2016).

Em 2017, foi relatado o primeiro caso de infecção por *A. kalrae* em

uma criança. Tratava-se de uma infecção pulmonar por *A. kalrae* em paciente com doença granulomatosa crônica. Um menino de 5 anos de idade que já havia tido infecção pulmonar por *Staphylococcus aureus* apresentou infecção por *A. kalrae*. Após tratamento com posaconazol e 9 meses de acompanhamento houve resolução das lesões (CAMPOVERDE ESPINOZA et al., 2017).

Em 2019, foi relatado mais um caso de infecção pulmonar por *A. kalrae* em criança, sendo que esta apresentava fibrose cística. O menino de 7 anos de idade apresentou declínio da função pulmonar, foi tratado com antibióticos, mas sem melhoras. Depois que *A. kalrae* foi isolado do lavado broncoalveolar, o paciente foi tratado com itraconazol por 6 semanas e sua função pulmonar melhorou (FISCARELLI et al., 2019).

2.2 BIOFILMES

Biofilme é uma comunidade microbiana fixada a uma superfície biótica ou abiótica que é capaz de produzir sua própria matriz extracelular (ECM) e apresenta fenótipo distinto das suas células em suspensão (células planctônicas) (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014). O biofilme representa um importante fator de virulência dos microrganismos, visto que proporciona proteção contra agentes antimicrobianos e contra as defesas do hospedeiro (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014; HERNÁNDEZ-CHÁVEZ et al., 2017).

Os principais motivos para os estudos envolvendo a formação de biofilme são a gravidade e recorrência de infecções devido ao crescimento de biofilmes em dispositivos implantados em pacientes e o crescimento de biofilmes *in vivo*. Os biofilmes podem crescer em cateteres, próteses de articulação e válvulas cardíacas mecânicas (DAROUICHE, 2001) fornecendo um reservatório contínuo de agentes infecciosos, levando a infecções recorrentes e difíceis de serem tratadas devido à resistência a antimicrobianos das células de biofilme. Além disso, os biofilmes podem crescer em superfícies mucosas causando, por exemplo, sapinho ou vaginite. Após uma infecção, o microrganismo invade a superfície da mucosa e forma um agregado levando à inflamação e danos teciduais (LAGREE; MITCHELL, 2017).

2.2.1 Biofilmes Fúngicos

Os fungos são capazes de formar biofilme assim como diversas espécies de bactérias. Os biofilmes fúngicos mais importantes clinicamente e mais amplamente estudados são os biofilmes de *Candida* spp. (KOJIC; DAROUICHE, 2004) e *Aspergillus* spp. (BEAUVAIS et al., 2007). Outras espécies de fungos também têm sido investigadas como formadoras de biofilme, como *Cryptococcus neoformans* (ASLANYAN et al., 2017), *Fusarium* spp. (IMAMURA et al., 2008), *H. capsulatum* (BRILHANTE et al., 2015) e *P. brasiliensis* (SARDI et al., 2015).

Os biofilmes de *Candida* spp. podem causar doença grave em pacientes com dispositivos implantados ou imunodeprimidos (ACHKAR; FRIES, 2010; LAUNAY et al., 1998). O desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans* envolve 4 fases: uma fase de aderência (60-90 minutos) de leveduras e lavagem de células não aderentes formando uma camada basal de leveduras, uma fase de proliferação celular e indução de formação de hifas, uma fase de maturação do biofilme (~ 24 horas) em que há formação de uma rede polimórfica de hifas, pseudohifas e leveduras envoltas por ECM e uma última fase que consiste na dispersão de células para colonização de novos locais (GULATI; NOBILE, 2016).

Aspergillus fumigatus é o mais importante patógeno fúngico transmitido pelo ar. Este fungo pode causar aspergilose invasiva que pode ser fatal para pacientes imunodeprimidos (LATGÉ; STEINBACH, 2008). O biofilme de *A. fumigatus* é filamentoso, diferente do biofilme de *C. albicans* que é de levedura. Existem duas formas de organização de hifas nos biofilmes *in vivo* de *A. fumigatus*: o aspergiloma que é uma bola de hifas entrelaçadas e a aspergilose invasiva em que as hifas são individualizadas e cobertas por ECM (FANNING; MITCHELL, 2012). No aspergiloma, o biofilme de *A. fumigatus* é formado a partir da adesão de conídios que crescem fortemente fixados à superfície com uma ECM (BEAUVAIS; LATGÉ, 2015).

A primeira etapa para a formação dos biofilmes é a adesão a uma superfície. Nos biofilmes de *C. albicans*, a adesão ocorre através de adesinas, proteínas da parede celular dos fungos que geralmente são proteínas ancoradas a Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) (LAGREE; MITCHELL, 2017). A família de adesinas Als (*Agglutinin-like sequence*) são as proteínas ancoradas a GPI mais conhecidas dos biofilmes de *C. albicans*. Defeitos na expressão de *ALS1* e *ALS3*, por exemplo, diminuem a aderência de *C. albicans* ao hospedeiro (NOBILE et al., 2006).

Uma característica importante dos biofilmes é a ECM e esta, apresenta diversas funções, como aderência à uma superfície, agregação entre células e armazenamento de nutrientes, sendo que a ECM confere resistência antifúngica às células de biofilme e também as protege das defesas do hospedeiro (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A estrutura, quantidade e composição da ECM variam de acordo com as espécies e com as condições de crescimento. A figura 2 mostra a diferença entre a ECM de *C. albicans* e de *A. fumigatus*. A ECM do biofilme de *C. albicans* é composta por carboidratos, proteínas, fósforo, glicose, hexosamina e ácido urônico, sendo que possui uma menor quantidade de carboidrato e proteína, mas uma maior quantidade de glicose que a matriz das células planctônicas (BAILLIE; DOUGLAS, 2000). Uma análise mais abrangente da ECM de *C. albicans* identificou proteínas (55%, predominantemente proteínas de vias relacionadas a carboidratos, aminoácidos e vias de metabolismo de energia), carboidratos (~25%, arabinose, manose, glicose e xilose), lipídeos (~15%, predominantemente glicerolipídeos) e DNA extracelular (eDNA, ~5%, quase exclusivamente de sequências não codificantes). Também foi identificado um complexo de manana-glucana (MGCx) que possui β -1,6 manana ramificada complexada com β -1,6 glucana linear e que pode ser um marcador específico para este biofilme. Este estudo também mostrou que a concentração do antifúngico fluconazol foi maior nos biofilmes após a remoção da ECM (ZARNOWSKI et al., 2014), evidenciando a importância da ECM para a resistência das células de biofilme aos antifúngicos.

A ECM do biofilme de *A. fumigatus* é composta por galactomanana, α -1,3 glucana, monossacarídeos, polióis, melanina e proteínas (incluindo antígenos de *A. fumigatus* como, dipeptidylpeptidase V (DPPV), catalase B (CatB) e ribotoxina (ASPF1)) (BEAUVAIS et al., 2007). Além disso, a ECM de *A. fumigatus* possui eDNA, que é importante para a resistência antifúngica (RAJENDRAN et al., 2013), e um importante polímero chamado galactosaminogalactan (GAG), que promove aderência a superfícies abióticas e a pneumócitos (FONTAINE et al., 2011) e que induz resistência a armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (LEE et al., 2015).

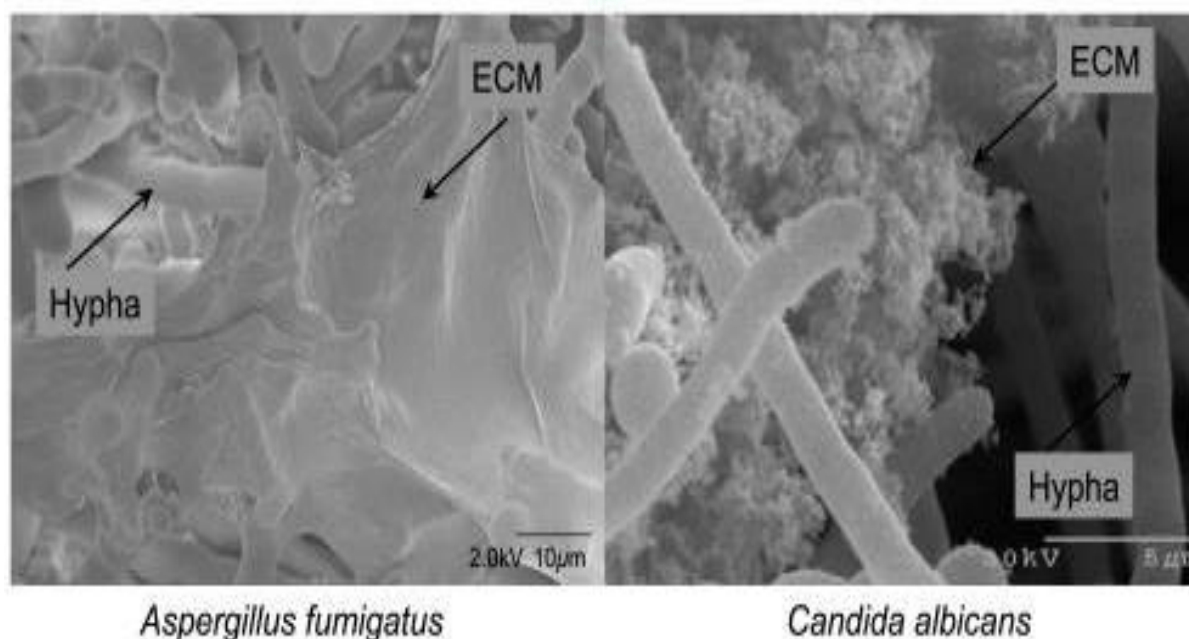


Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *A. fumigatus* (à esquerda) e de *C. albicans* (à direita) evidenciando a ECM. **Fonte:** Fanning e Mitchell (2012).

Existem fatores de transcrição que são fundamentais para a formação do biofilme, regulando proteínas de aderência e a indução de formação de hifas. O fator de transcrição BCR1, por exemplo, regula adesinas *ALS3* em biofilme de *C. albicans*, como exposto acima (NOBILE et al., 2006). Outros fatores de transcrição importantes para o biofilme de *C. albicans* são *ACE2*, envolvido na aderência e formação de hifas (MULHERN; LOGUE; BUTLER, 2006) e *EFG1*, regulador de proteínas de superfície celular e formação de hifas (FINKEL; MITCHELL, 2011). As proteínas de parede celular também são muito importantes para a formação do biofilme. No biofilme de *C. albicans* destacam-se as proteínas *ALS1*, *ALS3*, *CHT2*, *CHT3*, *CSA1*, *CSH1*, *EAP1*, *MP65*, *PGA10*, *PHO100*, *RBT4*, *SAP9*, *SUN41* e *YWP1* (CHAFFIN, 2008). No biofilme de *A. fumigatus* destacam-se as proteínas hidrofobinas *RodA*, *RodB* e *RodD*, sendo que entre estas, *RodB* é a mais positivamente regulada (GIBBONS et al., 2012).

2.2.2 Biofilmes Fúngicos e Resposta Imune do Hospedeiro

Como mencionado anteriormente, as infecções por biofilmes podem

ser difíceis de serem combatidas devido a sua resistência contra as defesas do hospedeiro. Sabe-se que o biofilme de *C. albicans* protege este fungo do sistema imune inato de diversas formas. Os neutrófilos, os primeiros a chegar ao local da infecção, atuam fagocitando os patógenos, liberando espécies reativas de oxigênio (EROs) e NETs para combater a infecção (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Porém, estudos mostram que o biofilme de *C. albicans* é resistente à morte por neutrófilos e também não induz uma produção eficaz de EROs por estas células, sem afetar a sua viabilidade, sendo a estrutura e ECM do biofilme responsáveis por esta resistência (KATRAGKOU et al., 2010; XIE et al., 2012). Além disso, os neutrófilos não conseguem liberar NETs para combater o biofilme de *C. albicans* e este processo de inibição da NETose foi relacionado à ECM (JOHNSON et al., 2016).

Os biofilmes de *C. albicans* também podem resistir à fagocitose por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e podem alterar seu perfil de produção de citocinas (CHANDRA et al., 2007). O biofilme de *C. albicans* diminui a produção de TNF- α (citocina que facilita a ativação de fagócitos) (KATRAGKOU et al., 2010), IL-6 e MIP1 β e aumenta a produção de IL-1 β , IL-10 e MCP-1 por monócitos (CHANDRA et al., 2007).

Os neutrófilos são de extrema importância contra o fungo *A. fumigatus*. A neutropenia em pacientes imunodeprimidos é um fator de risco para o desenvolvimento de aspergilose invasiva (FELDMESSER, 2006). Porém, assim como no biofilme de *C. albicans*, a ECM do biofilme de *A. fumigatus* o protege das NETs, sendo que o componente GAG da ECM está relacionado ao aumento da resistência ao processo de NETose (LEE et al., 2015).

Considerando que os biofilmes fúngicos são difíceis de tratar, podendo afetar pacientes com dispositivos implantados ou imunocomprometidos, estudos envolvendo a formação de biofilme são de extrema importância para a compreensão deste processo, favorecendo a elaboração de estratégias antibiofilme.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. Candida infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 253–273, abr. 2010.
- ASLANYAN, L. et al. The Crucial Role of Biofilms in *Cryptococcus neoformans* Survival within Macrophages and Colonization of the Central Nervous System. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 10, 24 fev. 2017.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 397–403, set. 2000.
- BEAUVAIS, A. et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1588–1600, jun. 2007.
- BEAUVAIS, A.; LATGÉ, J.-P. *Aspergillus* Biofilm In Vitro and In Vivo. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 4, ago. 2015.
- BISER, S. A. et al. Arthrographis Keratitis Mimicking *Acanthamoeba* Keratitis: **Cornea**, v. 23, n. 3, p. 314–317, abr. 2004.
- BOAN, P. et al. Refractory *Arthrographis kalrae* native knee joint infection. **Medical Mycology Case Reports**, v. 1, n. 1, p. 112–114, 2012.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 394–399, 1 abr. 2015.
- CAMPOVERDE ESPINOZA, C. J. et al. [Pulmonary infection by *Arthrographis kalrae* in patient with chronic granulomatous disease]. **Archivos Argentinos De Pediatría**, v. 115, n. 6, p. e458–e461, 1 dez. 2017.
- CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 72, n. 3, p. 495–544, set. 2008.
- CHANDRA, J. et al. Interaction of *Candida albicans* with Adherent Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Increases *C. albicans* Biofilm Formation and Results in Differential Expression of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2612–2620, maio 2007.
- CHIN-HONG, P. V. et al. Invasive Fungal Sinusitis and Meningitis Due to *Arthrographis kalrae* in a Patient with AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 804–807, 1 fev. 2001.
- CINO, P. M.; TEWARI, R. P. Proteolytic activity of *Oidiodendron kalrai*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, n. 9, p. 1362–1368, 1 set. 1975.
- CINO, P. M.; TEWARI, R. P. Purification of *Oidiodendron kalrai* proteases. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 327–333, 1 mar. 1976.

DAROUICHE, R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 33, n. 9, p. 1567–1572, 1 nov. 2001.

DE DIEGO CANDELA, J. et al. Endocarditis Caused by *Arthrographis kalrae*. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 90, n. 1, p. e4–e5, jul. 2010.

DEGAVRE, B. et al. First report of mycetoma caused by *Arthrographis kalrae*: Successful treatment with itraconazole. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 37, n. 2, p. 318–320, ago. 1997.

DENIS, J. et al. First case of *Arthrographis kalrae* fungemia in a patient with cystic fibrosis. **Medical Mycology Case Reports**, v. 14, p. 8–11, dez. 2016.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 10, p. a019729–a019729, 1 out. 2014.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 5 abr. 2012.

FELDMESSER, M. Role of Neutrophils in Invasive Aspergillosis. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 12, p. 6514–6516, 1 dez. 2006.

FERNÁNDEZ-BARRIENTOS, Y. et al. Post-laser in situ keratomileusis interface *Arthrographis kalrae* keratitis. **Arquivos Brasileiros De Oftalmologia**, v. 83, n. 1, p. 65–68, fev. 2020.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109–118, fev. 2011.

FISCARELLI, E. V. et al. A cystic fibrosis child with lung function decline. **Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society**, v. 18, n. 6, p. e62–e64, nov. 2019.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, set. 2010.

FONTAINE, T. et al. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002372, nov. 2011.

GIBBONS, J. G. et al. Global Transcriptome Changes Underlying Colony Growth in the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 1, p. 68–78, jan. 2012.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 310–321, maio 2016.

HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. et al. Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 51, 23 set. 2017.

IMAMURA, Y. et al. Fusarium and Candida albicans biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 171–182, jan. 2008.

JOHNSON, C. J. et al. The Extracellular Matrix of Candida albicans Biofilms Impairs Formation of Neutrophil Extracellular Traps. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005884, 13 set. 2016.

KATRAGKOU, A. et al. Interactions between Human Phagocytes and Candida albicans Biofilms Alone and in Combination with Antifungal Agents. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 12, p. 1941–1949, 15 jun. 2010.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. Candida infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255–267, abr. 2004.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, mar. 2013.

LAGREE, K.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms: Inside Out. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 2, abr. 2017.

LATGÉ, J.-P.; STEINBACH, W. J. A Perspective on Aspergillus fumigatus Research for the Next Ten Years. In: **Aspergillus fumigatus and Aspergillosis**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2008. p. 547–558.

LAUNAY, O. et al. Candidemia: a nosocomial complication in adults with late-stage AIDS. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 26, n. 5, p. 1134–1141, maio 1998.

LEE, M. J. et al. The Fungal Exopolysaccharide Galactosaminogalactan Mediates Virulence by Enhancing Resistance to Neutrophil Extracellular Traps. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005187, out. 2015.

MULHERN, S. M.; LOGUE, M. E.; BUTLER, G. Candida albicans transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 12, p. 2001–2013, dez. 2006.

NAGASHIMA, L. A. et al. Arthrographis kalrae soluble antigens present hemolytic and cytotoxic activities. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 5–6, p. 305–311, dez. 2014.

NAGASHIMA, L. A. et al. Immunomodulation over the course of experimental Arthrographis kalrae infection in mice. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 48, p. 79–86, out. 2016.

NOBILE, C. J. et al. Critical Role of Bcr1-Dependent Adhesins in C. albicans Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 7, jul. 2006.

ONG, D. C.-G. et al. Case report: Eumycetoma and mycotic arthritis of the knee caused by Arthrographis kalrae. **Journal of Orthopaedics**, v. 12, p. S140–S144, out. 2015.

PERLMAN, E. M.; BINNS, L. Intense Photophobia Caused by *Arthrographis kalrae* in a Contact Lens-wearing Patient. **American Journal of Ophthalmology**, v. 123, n. 4, p. 547–549, abr. 1997.

PICHON, N. et al. Fatal-Stroke Syndrome Revealing Fungal Cerebral Vasculitis Due to *Arthrographis kalrae* in an Immunocompetent Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 3152–3155, 1 set. 2008.

PONIKAU, J. U. et al. The Diagnosis and Incidence of Allergic Fungal Sinusitis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 9, p. 877–884, set. 1999.

RAJENDRAN, R. et al. Extracellular DNA Release Acts as an Antifungal Resistance Mechanism in Mature *Aspergillus fumigatus* Biofilms. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 3, p. 420–429, mar. 2013.

RAMAGE, G. et al. Biofilm Formation by *Candida dubliniensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3234–3240, 1 set. 2001.

RAMAGE, G. et al. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 324, n. 2, p. 89–97, 1 nov. 2011.

RAMLI, S. R. et al. A Severe Case of *Arthrographis kalrae* Keratomycosis. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2013, p. 1–3, 2013.

SAINAGHI, P. P. et al. *Arthrographis kalrae* arthritis: a new case report. **Le Infezioni in Medicina**, v. 23, n. 2, p. 192–194, 2015.

SARDI, J. DE C. O. et al. *In vitro Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642–651, 18 ago. 2015.

SHUMOTO, G. et al. Immunohistochemical Cross-Reactivity Between *Arthrographis kalrae* and Highly Pathogenic *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Paracoccidioides* Fungal Species. **Mycopathologia**, v. 184, n. 3, p. 393–402, jun. 2019.

SIGLER, L.; CARMICHAEL, J. W. Redisposition of some fungi referred to *Oidium microspermum* and a review of *Arthrographis*. **Mycotaxon**, v. 18, n. 2, p. 495–507, 1983.

SUGIURA, Y.; HIRONAGA, M. *Arthrographis kalrae*, a rare causal agent of onychomycosis, and its occurrence in natural and commercially available soils. **Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 384–389, mar. 2010.

SWENBERG, J. A.; KOESTNER, A.; TEWARI, R. P. Experimental mycotic encephalitis. **Acta Neuropathologica**, v. 13, n. 1, p. 75–90, 1969.

TEWARI, R. P.; MACPHERSON, C. R. Pathogenicity and Neurological Effects of *Oidiodendron kalrai* for Mice¹. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 3, p. 1130–1139, 1968.

TEWARI, R. P.; MACPHERSON, C. R. Cross-protection between *Histoplasma*

capsulatum and *Oidiodendron kalrai* in mice. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 37, n. 1, p. 97–103, jan. 1969.

TEWARI, R. P.; MACPHERSON, C. R. A New Dimorphic Fungus, *Oidiodendron kalrai*: Morphological and Biochemical Characteristics. **Mycologia**, v. 63, n. 3, p. 602–611, maio 1971.

TEWARI, R. P.; MACPHERSON, C. R.; MAITRA, T. K. Serological and skin test cross-reactivity between *Histoplasma capsulatum* and *Oidiodendron kalrai*. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 39, n. 2, p. 113–120, nov. 1969.

THOMAS, B. C. et al. Severe *Arthrographis kalrae* Keratomycosis in an Immunocompetent Patient: **Cornea**, v. 30, n. 3, p. 364–366, mar. 2011.

TING, D. S. J. et al. *Arthrographis kalrae* Keratitis Complicated by Endophthalmitis: A Case Report With Literature Review. **Eye & Contact Lens**, v. 46, n. 6, p. e59–e65, nov. 2020.

VOLLEKOVÁ, A.; LISALOVÁ, M.; PO CZOVÁ, M. [*Arthrographis kalrae*--an uncommon causative agent of onychomycosis]. **Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Spolecnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti J.E. Purkyne**, v. 57, n. 2, p. 53–56, abr. 2008.

VOS, C. G. et al. A rare pulmonary infection caused by *Arthrographis kalrae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 593–595, 1 abr. 2012.

XI, L. et al. First Case of *Arthrographis kalrae* Ethmoid Sinusitis and Ophthalmitis in the People's Republic of China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4828–4831, 1 out. 2004.

XIE, Z. et al. *Candida albicans* Biofilms Do Not Trigger Reactive Oxygen Species and Evade Neutrophil Killing. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 12, p. 1936–1945, 15 dez. 2012.

ZARNOWSKI, R. et al. Novel Entries in a Fungal Biofilm Matrix Encyclopedia. **mBio**, v. 5, n. 4, 5 ago. 2014.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Demonstrar a formação de biofilme por *A. kalrae* e comparar as atividades citotóxica e hemolítica entre os extratos de biofilme e de células planctônicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter biofilme de *A. kalrae*;
- ✓ Quantificar a biomassa total do biofilme de *A. kalrae*;
- ✓ Comprovar a formação de biofilme de *A. kalrae* através de microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Obter extratos totais de células planctônicas e de biofilme de *A. kalrae*;
- ✓ Investigar a atividade citotóxica dos extratos totais obtidos;
- ✓ Investigar a atividade hemolítica dos extratos totais obtidos.

4 ARTIGO: *IN VITRO* *Arthrographis kalrae* BIOFILM FORMATION: SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, CYTOTOXIC AND HEMOLYTIC ACTIVITIES

ABSTRACT

Arthrographis kalrae, an opportunistic pathogen, is a thermally dimorphic fungus that presents hemolytic and cytotoxic activities. The ability to form biofilm is an important virulence factor of microorganisms and the aim of the current work was to demonstrate the biofilm formation by *A. kalrae* and to analyze its cytotoxic and hemolytic activities. The biofilm assay was performed on polystyrene plates at different incubation times (4, 12, 24, 36, and 48 h) and the biofilm total biomass was examined by crystal violet staining. *A. Kalrae* biofilm grown for 24 and 48 hours in polystyrene and glass coverslips were analyzed by scanning electron microscopy. *A. kalrae* planktonic and biofilm total extracts were evaluated by cytotoxicity (with RAW 264.7 and JURKAT cell lines) and hemolysis assays (with sheep red blood cells). Biofilm with a progressive increase in total biomass over time and with the development of an extracellular matrix were observed. High cytotoxicity and low hemolytic activity were observed with biofilm, differentiating from planktonic *A. kalrae* extracts. This study represents the first demonstration of biofilm formation by *A. kalrae* and the results showed that the cytotoxic factor is more evident in this form, which may be due to distinct phenotypic expression by biofilm.

Key words: Cytotoxicity. Fungi. Hemolysis. Virulence factors.

4.1 INTRODUCTION

Arthrographis kalrae is a thermally dimorphic fungus that is considered a rare and opportunistic human pathogen. However, infections have been reported in both immunodeficient (CHIN-HONG et al., 2001) and immunocompetent individuals (PICHON et al., 2008; THOMAS et al., 2011). In addition, the number of reports of diseases involving *A. kalrae* in humans has been growing, such as cases of keratitis (PERLMAN; BINNS, 1997; RAMLI et al., 2013; TING et al., 2020), pulmonary infection (VOS et al., 2012; CAMPOVERDE ESPINOZA et al., 2017), sinusitis (PONIKAU et al., 1999), onychomycosis (SUGIURA; HIRONAGA, 2010), eumycetoma (DEGAVRE et al., 1997), arthritis (SAINAGHI et al., 2015), meningitis (CHIN-HONG et al., 2001), stroke (PICHON et al., 2008) and endocarditis (DE DIEGO CANDELA et al., 2010).

Although *A. kalrae* can be isolated from the soil (SUGIURA; HIRONAGA, 2010), its mechanism of infection is unknown. Regarding the pathogenesis of *A. kalrae* infection, it is known that this fungus is capable of inducing neurological syndrome in mice, with manifestations of hyperirritability, jumping, turning, and ataxia, causing lesions mainly in the brain and kidney (TEWARI; MACPHERSON, 1968). In experimental mycotic encephalitis, the mycelial form of this fungus was shown to be its invasive form (SWENBERG; KOESTNER; TEWARI, 1969). It has also been demonstrated that this fungus has important proteolytic (CINO; TEWARI, 1975), hemolytic, and cytotoxic activities (NAGASHIMA et al., 2014).

One of the relevant virulence factors of microorganisms is their ability to produce biofilm. Biofilm is a microbial community associated with a surface that is capable of producing its own extracellular matrix and has a distinct phenotype from its cells in planktonic forms (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014). Biofilm may be formed on different surfaces such as rocks, sediments, skin, and mucous tissues (KOLTER; GREENBERG, 2006). However, the main reason for studies involving biofilm formation is that biofilms which grow on devices implanted for medical follow-up of the patient, such as catheters, are the main cause of recurrent infections in hospitals. Recurrent infections are related to the resistance of biofilms to drugs (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014). In this context, several fungal species have been investigated as biofilm producers, such as *Candida* spp. (RAMAGE et al., 2001a; KOJIC; DAROUICHE, 2004), *Aspergillus* spp. (BEAUVAIS et al., 2007; RAMAGE et al., 2011), *Cryptococcus neoformans* (ASLANYAN et al., 2017), *Fusarium* spp. (IMAMURA et al.,

2008), *Histoplasma capsulatum* (BRILHANTE et al., 2015) and *Paracoccidioides brasiliensis* (SARDI et al., 2015). Regarding *A. kalrae*, there are no data in the literature. Therefore, the current work investigated the biofilm formation by *A. kalrae* and its cytotoxic and hemolytic activities.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Microorganism and Cell Lines

In the current study, *A. kalrae* IFM 55165 isolate from a cutaneous cat injury, provided by the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis at the University of Chiba, Japan, was used. The fungus was maintained at 36 °C in a 4% Sabouraud dextrose agar culture medium, with peaks every five days. The JURKAT cells (human T lymphocyte cell line) was provided by Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan (in 1993) and the RAW 264.7 cells (murine macrophage cell line) was obtained from Dr. Fábio Henrique Kwasniewski, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

4.2.2 *A. kalrae* Biofilm Formation

A. kalrae yeasts grown on 4% Sabouraud dextrose agar at 36 °C for five days were collected and suspended in sterile 0.15 M PBS (phosphate-saline buffer) at pH 7.2. The suspension was centrifuged at 1512 x *g* for 5 min at RT and the fungus pellet was suspended in 2 mL of PBS. Fungal concentration was adjusted to 1 x 10⁸ cells/mL in RPMI 1640 supplemented with 2% glucose and added (200 µL) to each well of 96-well polystyrene microplates. As a negative control, 200 µL of RPMI 1640 supplemented with 2% glucose was also added in triplicate. Each microplate corresponded to an evaluation time, and the evaluated times were: 4h (pre-adhesion), 12h, 24h, 36h, and 48h. The microplates were incubated for 4 hours at 37 °C and 5% CO₂ for pre-adhesion of the biofilm. After pre-adhesion for 4 hours, the supernatant was removed from each well of the 5 microplates, the total biofilm biomass of the 4h plate was determined and 200 µL of RPMI 1640 supplemented with 2% glucose and 10% fetal bovine serum (FBS) was added to the other plates, which was again

incubated. Two independent experiments were carried out under the same conditions.

4.2.3 *A. kalrae* Total Biofilm Biomass

The analysis of the total biofilm biomass was performed as described by Brilhante et al. (2015) with some modifications. The supernatant was removed (after 12h, 24h, 36h, and 48h), washed and then fixed with methanol for 15 min. After drying, 200 μ L of the crystal violet solution (0.1%) was added and kept in each well for 15 minutes. The crystal violet solution was removed, washed, and 200 μ L of acetic acid (33%) was added to release the dye. The solution was transferred to another microplate and read in a spectrophotometer (Multiskan EX, Uniscience-Labsystems, Helsinki, Finland) at 550 nm. The results are expressed in optical density (O. D.).

4.2.4 Scanning Electron Microscopy (SEM)

For the analysis of *A. kalrae* biofilm, the biofilm assay was performed as described above on 10x10 mm polystyrene pieces deposited in 24-well plates. Biofilms of 24 and 48 hours of growth were analyzed. After these incubation periods, the RPMI was removed, the wells were washed twice with PBS and the biofilm was left to dry at RT. Next, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) was added to the wells at RT for 2 h to fix the biofilm. After this period, the biofilm was washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer and dehydrated in increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 80, 90, and 3x 100%). The samples were then dried using the hexamethyldisilazane reagent and metallized with gold. In addition, *A. kalrae* biofilms grown in 13 mm glass coverslips were also analyzed. The method used was the same, except that these samples were dried to the critical point and then metallized with gold. Visualization was performed in the FEI SCIOS high resolution scanning electron microscope.

4.2.5 Total Extract of *A. kalrae*

To obtain total extract (TE), *A. kalrae* yeasts grown on Sabouraud dextrose agar 4% at 36 °C and cultured biofilm cells (obtained according to the biofilm assay described above) grown for six days were collected and suspended in distilled

water with 2.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, protease inhibitor). Next, the cells were macerated in a mortar with acetone and liquid nitrogen and the suspension was centrifuged at 1512 x *g* for 10 min at RT. The supernatant was centrifuged at 16128 x *g* at 4 °C for 10 min and the resulting supernatant (total extract) was aliquoted and its protein concentration determined in a NanoDrop Lite UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Aliquots were stored at -80 °C until use.

4.2.6 Cytotoxicity Assay

RAW 264.7 and JURKAT cell lines (1×10^6 cells/mL) were seeded on 96-well plates, in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, in a final volume of 100 μ L, and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. After this period, the cells were washed and incubated with TE from planktonic and biofilm cells of *A. kalrae* (200, 400, and 800 μ g/mL for JURKAT cells; 100, 400, and 800 μ g/mL for RAW 264.7 cells) at 37°C and 5% CO₂ for 72 h. The cytotoxic effect was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method with a Promega kit (Cell Titer 96®, Non-Radioactive, Cell Proliferation Assay) according to the manufacturer's instructions.

4.2.7 Hemolysis Assay

Commercial sheep red blood cells - SRBC (NEWPROV, Pinhais, Paraná, Brazil) suspension at 1% in PBS was added to TE (40 mg/L) from planktonic cells and biofilm (vol/vol) samples, pure and diluted in series (ratio 1:2) and incubated in "V" bottom plates for 3 h at 36 °C. PBS was used as a negative control and distilled water as a positive control for hemolysis. The plates were centrifuged at 155 x *g* and 4 °C for 10 min, the supernatants were collected, transferred to another plate that was read in a spectrophotometer (Multiskan EX, Uniscience-Labsystems, Helsinki, Finland) at 550 nm. Then, the percentage of hemolysis was calculated.

4.2.8 Statistical Analysis

In the analysis of total biofilm biomass, the Kolmogorov–Smirnov test

was used, followed by one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons between the groups evaluated. In the cytotoxicity and hemolysis assay, the Shapiro-Wilk normality test was used, followed by two-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons between the groups evaluated. A p-value <0.05 was assumed to be significant. The analyses were performed using Graphpad Prism 6.01 software (Graphpad Software, San Diego, California, USA).

4.3 RESULTS

4.3.1 *A. kalrae* Total Biofilm Biomass

The results of analysis of total biomass with crystal violet solution demonstrated a progressive increase in *A. kalrae* biomass during 12, 24, 36, and 48 h of incubation (Figure 1), with statistical difference between all analyzed times ($p < 0.05$). In addition, the aggregation of fungi on the plate, suggest the formation of mature biofilm in 24-48 h by the fungus *A. kalrae*.

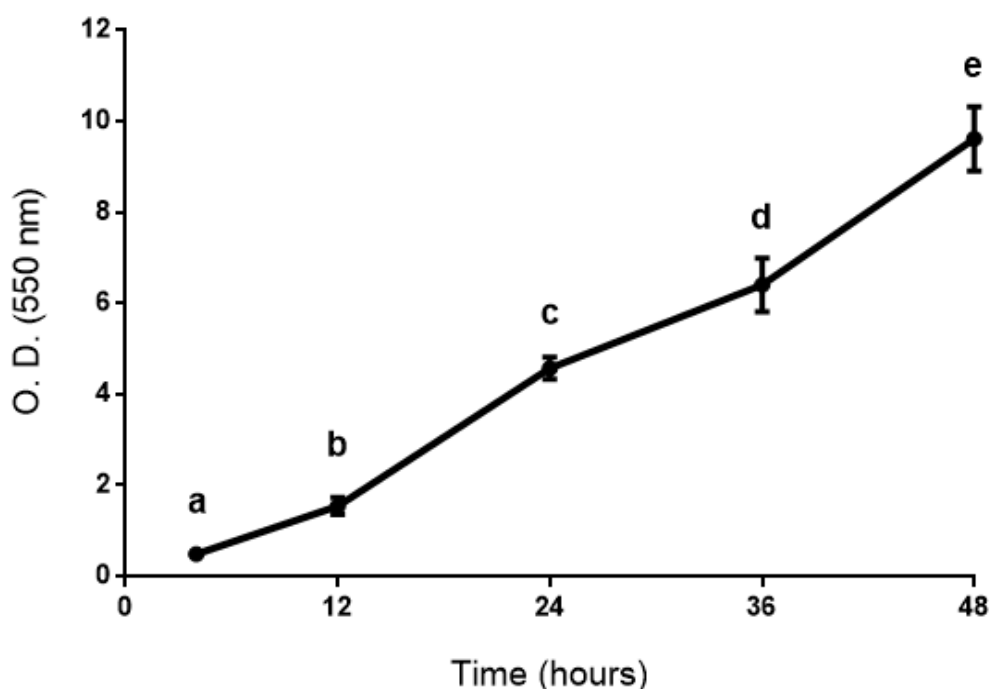


Figure 1. Kinetics of biofilm formation by *A. kalrae* on polystyrene microplates determined by crystal violet staining. The values expressed in O. D. represent the average of two independent experiments. The letters indicate statistical difference between all analyzed times ($p < 0.0001$).

4.3.2 A. *Kalrae* Biofilm (SEM)

The results of scanning electron microscopy demonstrated the presence of an extracellular matrix (ECM), a typical biofilm structure, on both polystyrene and glass coverslips. On both supports, the presence of elongated hyphae interlaced with the presence of ECM was observed after 24 h of culture (Figure 2). In 48-hour biofilms, a strong aggregation of fungi with a greater amount of ECM area was observed with an aspect of strong cohesion between hyphae (Figure 3), suggesting the presence of more mature biofilms.

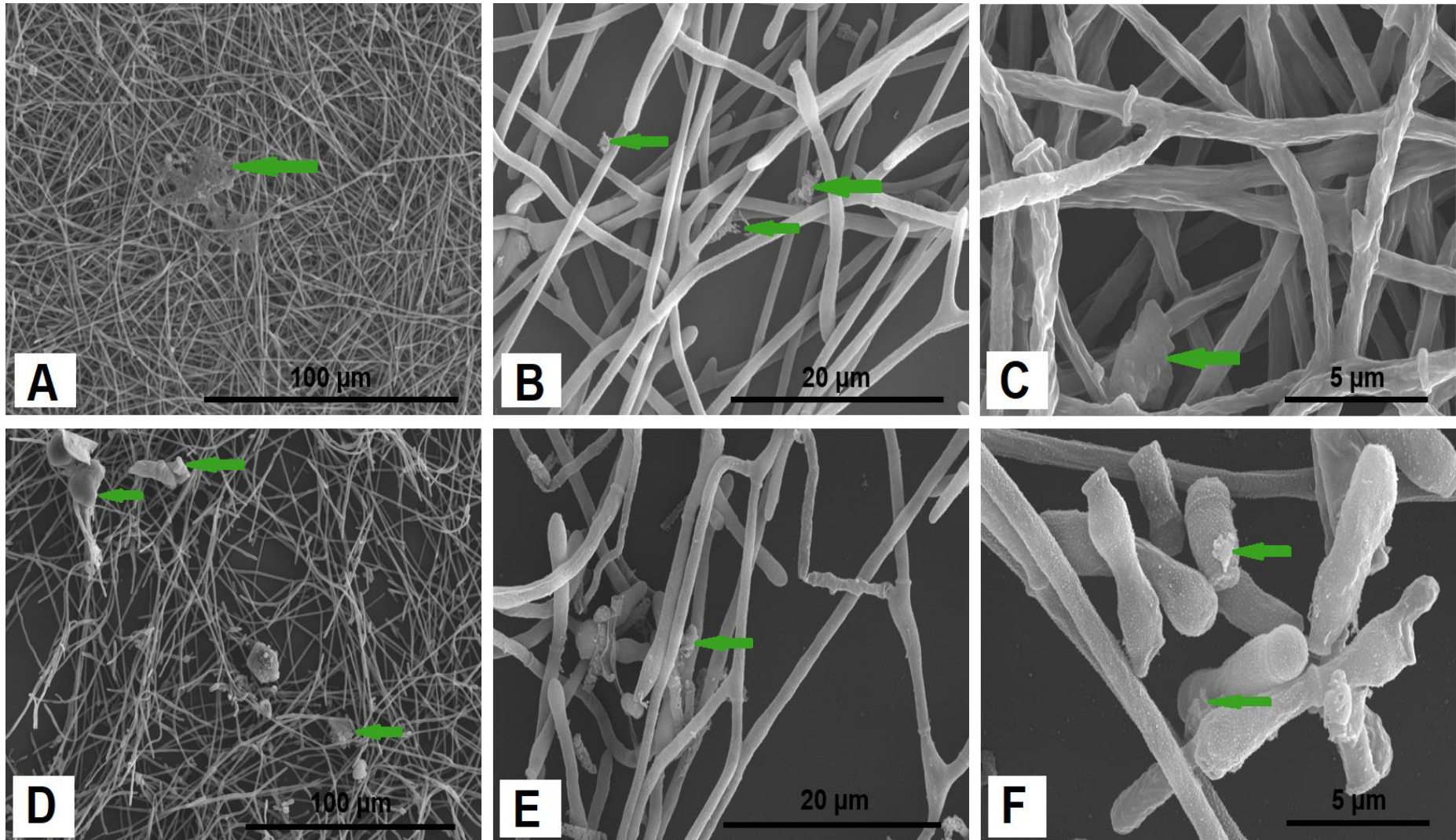


Figure 2. Scanning electron microscopy of *A. kalrae* biofilm grown for **24 hours**, *in vitro*. The green arrows point to the extracellular matrix. A - C: *A. kalrae* biofilm grown on polystyrene. D - F: *A. kalrae* biofilm grown on glass coverslips. Magnification: 1000x (A, D), 5000x (B, E), 25000x (C, F).

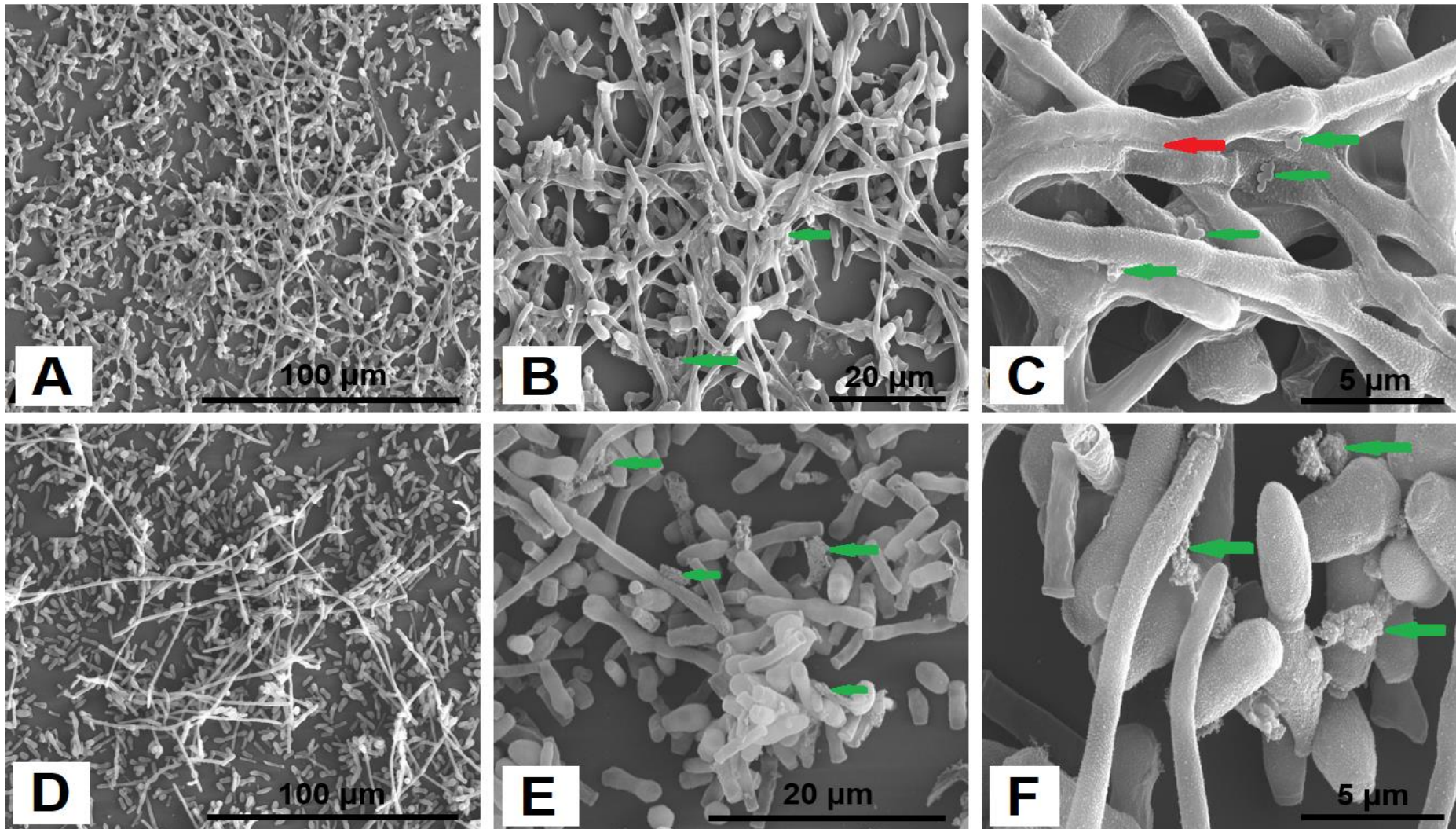


Figure 3. Scanning electron microscopy of the biofilm of *A. kalrae* grown for **48 hours**, *in vitro*. The green arrows point to the extracellular matrix. A - C: *A. kalrae* biofilm grown on polystyrene. D - F: *A. kalrae* biofilm grown on glass coverslips. Magnification: 1000x (A, D), 5000x (B, E), 25000x (C, F). The red arrow points to the strong cohesion between hyphae (C).

4.3.3 Cytotoxicity of Planktonic and Biofilm Total Extract on RAW 264.7 Cells

A progressive decrease in cell viability of RAW 264.7 cells with increased concentration of total extract from biofilm was observed. This decrease was statistically different from control without extract ($p < 0.005$). No cytotoxic activity was observed with extract from planktonic cells ($p > 0.05$) (Figure 4).

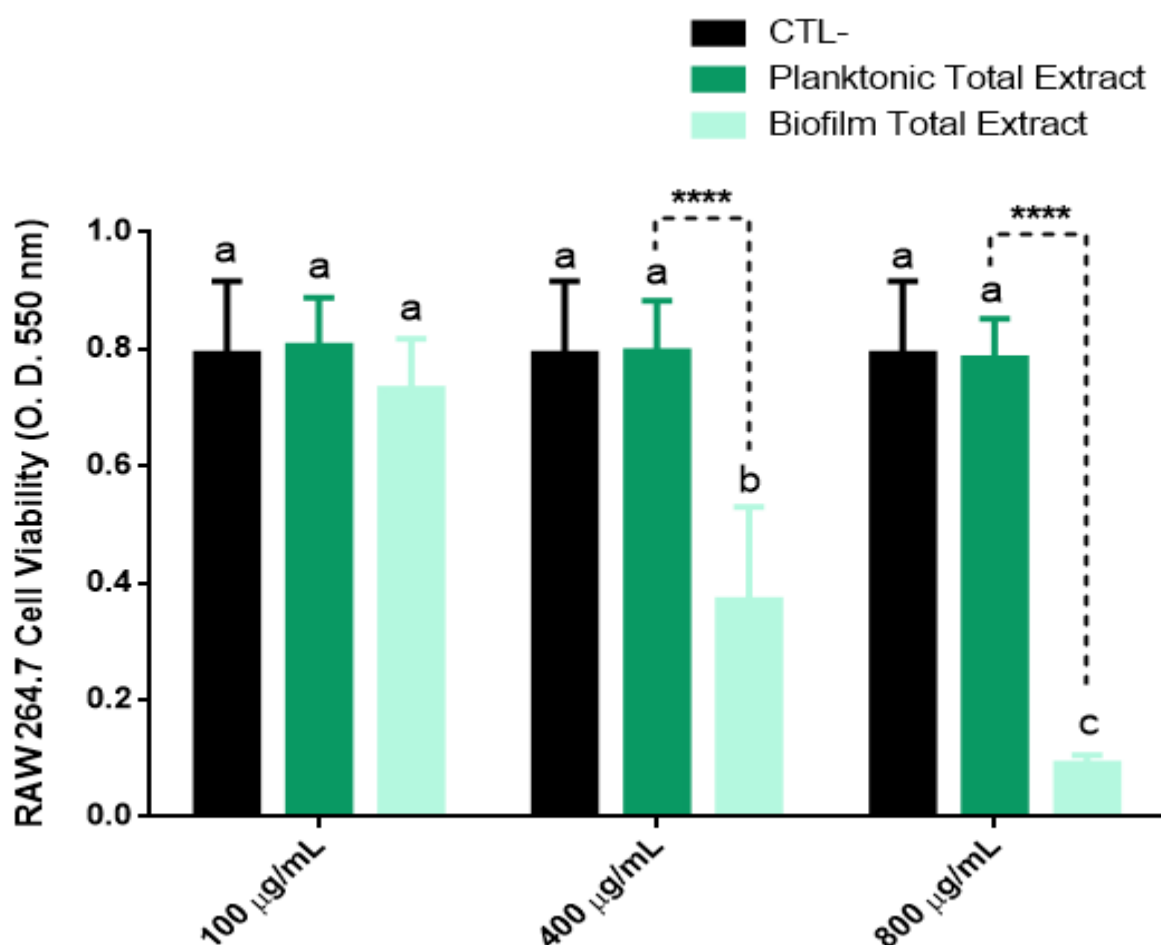


Figure 4. Viability of RAW 264.7 cells treated with total extract of *A. kalrae* planktonic and biofilm cells. The letters indicate statistical difference in relation to the control and the asterisks indicate statistical difference between the groups ($p < 0.0001$).

4.3.4 Cytotoxicity of Planktonic and Biofilm Total Extract on JURKAT Cells

A progressive decrease in cell viability of JURKAT cells was observed with increased concentration of total extract from both planktonic cells and biofilm. The

decrease was greater in the group treated with biofilm extract than from planktonic cells, dependent of the doses used ($p < 0.05$) (Figure 5).

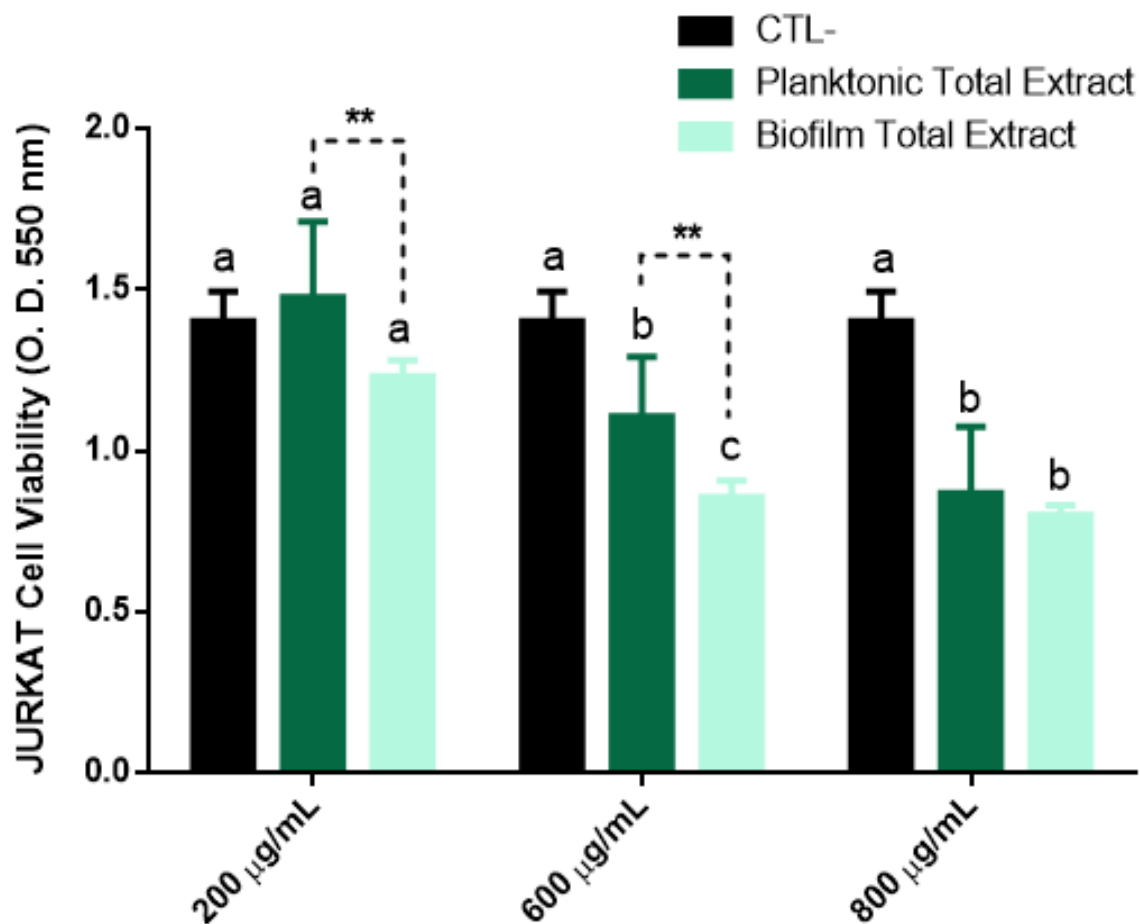


Figure 5. Viability of JURKAT cells treated with total extract of *A. kalrae* planktonic and biofilm cells. The letters indicate statistical difference in relation to the control and the asterisks indicate statistical difference between the groups ($p < 0.05$).

4.3.5 Hemolysis Assay

Hemolysis of sheep's erythrocytes was observed in all (pure and diluted) planktonic *A. kalrae* total extract samples and only in the pure and diluted 1:2 sample of biofilm *A. kalrae* extract (Figure 6).

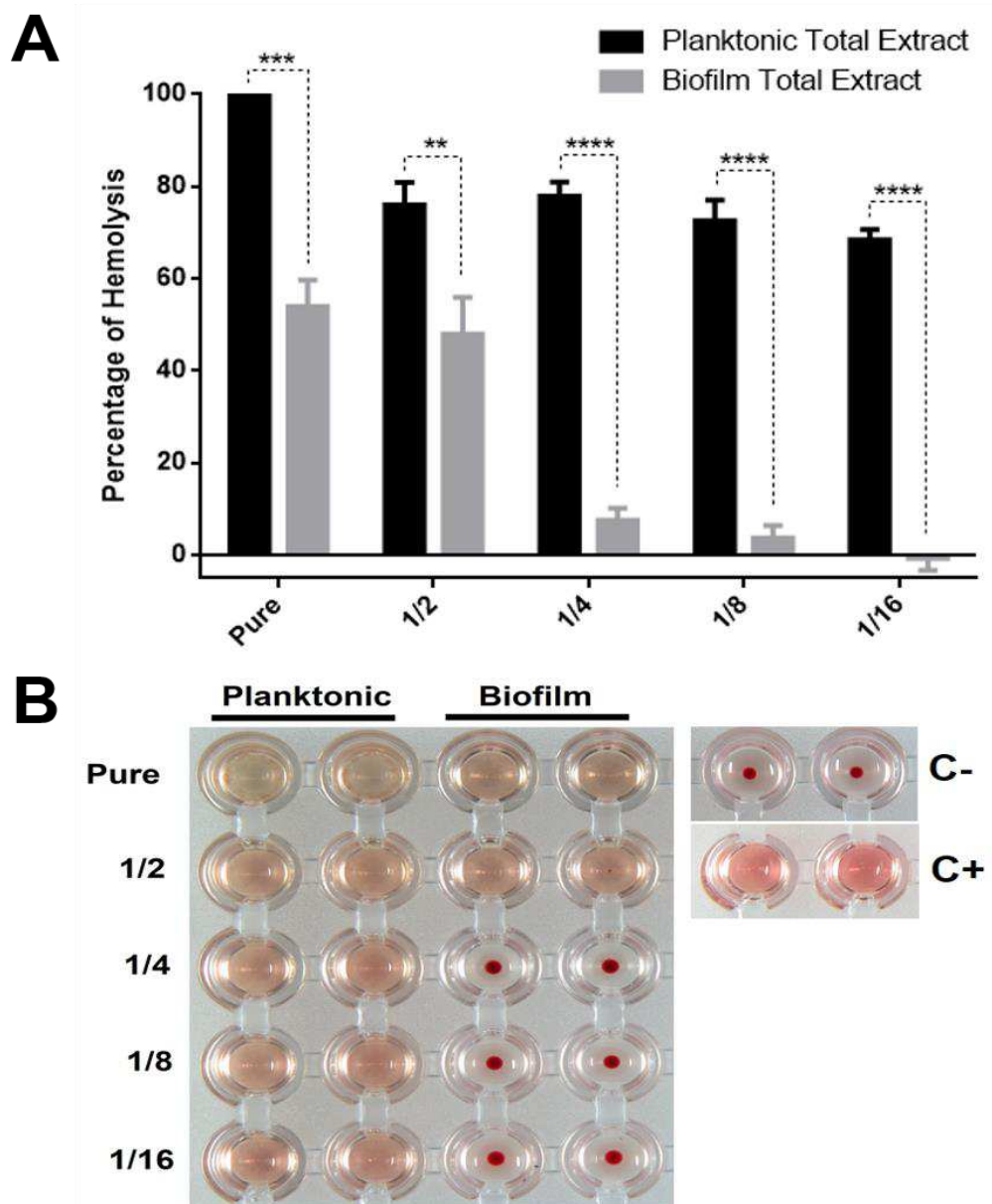


Figure 6. Hemolysis assay with total extract of *A. kalrae* planktonic and biofilm. Samples: pure and diluted 1/2, 1/4, 1/8, and 1/16, in duplicate. A: Percentage of hemolysis. B: Hemolysis assay; C-: negative control (PBS); C+: positive control (distilled water).

4.4 DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study on *A. kalrae* biofilm formation. The presence of ECM, a typical biofilm structure, detected by scanning electron microscopy on polystyrene and glass coverslips, indicates the ability of *A. kalrae* to

form biofilm on both supports. The increase in total biomass in 24-48h of culture and strong aggregation of fungi with a dense ECM area mainly at 48h, suggest mature biofilm production by *A. kalrae* in the short-term. This short-term, could also be due to the presence of serum in *A. kalrae* biofilm culture. According to Frade and Arthington-Skaggs (2011), the presence of serum accelerates the *Candida albicans* biofilm formation process. The *in vitro* mature biofilm formation in 48h is in accordance with other fungi such as *C. dubliniensis*, *C. albicans*, and *C. neoformans* (RAMAGE et al., 2001a; RAMAGE et al., 2001b; MARTINEZ; CASADEVALL, 2005). However, the aspect of ECM observed with *A. kalrae* (Fig. 3B and 3C) was similar to ECM from *Aspergillus fumigatus* biofilms, and different to *C. albicans* ECM (FANNING; MITCHELL, 2012).

Biofilm formation impacts not only antifungal drug resistance, but also host immune response. According to Kernien et al. (2018), biofilm can protect fungal pathogens from the innate immune system, by suppressing neutrophils and monocytes killing or by modulating the monocyte/macrophage cytokine profile. As innate immune response can modulate the adaptive response (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018), biofilm also impacts the host adaptive immune response.

In previous works, it was evidenced that *A. kalrae* in their planktonic form present cytotoxic activity to mouse myeloma cell line (P3U1) (NAGASHIMA et al., 2014). In this work, it was evidenced that the murine macrophage cell line (RAW 264.7) and human T cell line (JURKAT), are also susceptible to *A. kalrae* cytotoxicity. Interestingly, to a lesser extent, in the current study cytotoxic activity was also detected with JURKAT cell line, in both *A. kalrae* planktonic and biofilm extracts but only with biofilm on RAW 264.7 cells. In both cell lines, cytotoxic activity was observed with high protein concentration, which differs from data obtained by Nagashima et al. (2014) with lower doses. This difference may be due to the greater resistance of the cell lines used herein, or it may be due to the type of antigen used. Nagashima et al. (2014) used CFA (cell-free antigen), while total extract was used in the current study. Interestingly, the current work showed greater cytotoxic activity with extract from biofilm compared to the planktonic form, suggesting greater expression of this factor when in the form of biofilm.

A case of recurrent *A. kalrae* endocarditis was reported by De Diego Candela et al. (2010) in which the patient underwent several surgical procedures due to the recurrence of *A. kalrae* infection died during surgery. As the patient used a

mechanical prosthesis, it was suggested that *A. kalrae* biofilm could have been the cause of the severity and recurrence of the infection. This case points to the ability of *A. kalrae* to form biofilm, as an important virulence factor that resistance to antifungal drugs as well as immune response suppression may have participated as impacting factors.

Hemolysis may be a relevant virulence factor, since iron is an essential nutrient for most organisms. According to Manns et al. (1994), *C. albicans* expresses a hemolytic factor which allows it to acquire iron from host erythrocytes. Although this growth factor may be important during *in vivo* infection, expression of this factor is maintained even in planktonic and biofilm *in vitro* forms. In the current work, the activity was greater in planktonic cells than in biofilm. Our hemolysis results were in agreement with those obtained by Nagashima et al. (2014), with soluble components of planktonic cells of *A. kalrae*. According to these authors, the cytotoxic factor may be not the same as the hemolytic factor, due to distinct molecular mass. In the current study, a distinct factor was also suggested and is possibly less expressed in the biofilm form, which requires additional studies.

Taken together, the current work demonstrates for the first time that *A. kalrae* presents the capacity to form biofilm *in vitro*, that the biofilm has cytotoxic and hemolytic activities, and that the cytotoxic factor is more evident in this form.

REFERENCES

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**, 9^a ed. Philadelphia: Elsevier, 2018.
- ASLANYAN, L. et al. The Crucial Role of Biofilms in *Cryptococcus neoformans* Survival within Macrophages and Colonization of the Central Nervous System. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 10, 24 fev. 2017.
- BEAUVAIS, A. et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1588–1600, jun. 2007.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 394–399, 1 abr. 2015.
- CAMPOVERDE ESPINOZA, C. J. et al. [Pulmonary infection by *Arthrographis kalrae* in patient with chronic granulomatous disease]. **Archivos Argentinos De Pediatría**, v. 115, n. 6, p. e458–e461, 1 dez. 2017.
- CHIN-HONG, P. V. et al. Invasive Fungal Sinusitis and Meningitis Due to *Arthrographis kalrae* in a Patient with AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 804–807, 1 fev. 2001.
- CINO, P. M.; TEWARI, R. P. Proteolytic activity of *Oidiodendron kalrai*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, n. 9, p. 1362–1368, 1 set. 1975.
- DE DIEGO CANDELA, J. et al. Endocarditis Caused by *Arthrographis kalrae*. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 90, n. 1, p. e4–e5, jul. 2010.
- DEGAVRE, B. et al. First report of mycetoma caused by *Arthrographis kalrae*: Successful treatment with itraconazole. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 37, n. 2, p. 318–320, ago. 1997.
- DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 10, p. a019729–a019729, 1 out. 2014.
- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 5 abr. 2012.
- FRADE, J. P.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation: *Candida albicans* biofilm formation. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. e154–e162, jul. 2011.
- IMAMURA, Y. et al. *Fusarium* and *Candida albicans* biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 171–182, jan. 2008.
- KERNIEN, J. F. et al. The Interface between Fungal Biofilms and Innate Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1968, 10 jan. 2018.

- KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. Candida infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255–267, abr. 2004.
- KOLTER, R.; GREENBERG, E. P. Microbial sciences: the superficial life of microbes. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 300–302, 18 maio 2006.
- MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5154–5156, 1994.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6350–6362, out. 2005.
- NAGASHIMA, L. A. et al. *Arthrographis kalrae* soluble antigens present hemolytic and cytotoxic activities. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 5–6, p. 305–311, dez. 2014.
- PERLMAN, E. M.; BINNS, L. Intense Photophobia Caused by *Arthrographis kalrae* in a Contact Lens-wearing Patient. **American Journal of Ophthalmology**, v. 123, n. 4, p. 547–549, abr. 1997.
- PICHON, N. et al. Fatal-Stroke Syndrome Revealing Fungal Cerebral Vasculitis Due to *Arthrographis kalrae* in an Immunocompetent Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 3152–3155, 1 set. 2008.
- PONIKAU, J. U. et al. The Diagnosis and Incidence of Allergic Fungal Sinusitis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 9, p. 877–884, set. 1999.
- RAMAGE, G. et al. Biofilm Formation by *Candida dubliniensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3234–3240, 1 set. 2001a.
- RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 18, n. 4, p. 163–170, dez. 2001b.
- RAMAGE, G. et al. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 324, n. 2, p. 89–97, 1 nov. 2011.
- RAMLI, S. R. et al. A Severe Case of *Arthrographis kalrae* Keratomycosis. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2013, p. 1–3, 2013.
- SAINAGHI, P. P. et al. *Arthrographis kalrae* arthritis: a new case report. **Le Infezioni in Medicina**, v. 23, n. 2, p. 192–194, 2015.
- SARDI, J. DE C. O. et al. *In vitro Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642–651, 18 ago. 2015.
- SUGIURA, Y.; HIRONAGA, M. *Arthrographis kalrae*, a rare causal agent of onychomycosis, and its occurrence in natural and commercially available soils. **Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 384–389, mar. 2010.

SWENBERG, J. A.; KOESTNER, A.; TEWARI, R. P. Experimental mycotic encephalitis. **Acta Neuropathologica**, v. 13, n. 1, p. 75–90, 1969.

TEWARI, R. P.; MACPHERSON, C. R. Pathogenicity and Neurological Effects of *Oidiodendron kalrai* for Mice¹. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 3, p. 1130–1139, 1968.

THOMAS, B. C. et al. Severe *Arthrographis kalrae* Keratomycosis in an Immunocompetent Patient: **Cornea**, v. 30, n. 3, p. 364–366, mar. 2011.

TING, D. S. J. et al. *Arthrographis kalrae* Keratitis Complicated by Endophthalmitis: A Case Report With Literature Review. **Eye & Contact Lens**, v. 46, n. 6, p. e59–e65, nov. 2020.

VOS, C. G. et al. A rare pulmonary infection caused by *Arthrographis kalrae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 593–595, 1 abr. 2012.

CONCLUSÕES GERAIS

A. kalrae forma biofilme maduro com forte agregação de fungos com área densa de ECM em 48h.

Os extratos totais de células planctônicas e de biofilme de *A. kalrae* apresentam atividade citotóxica em linhagem de células T humanas (JURKAT). Porém, apenas o extrato total de biofilme de *A. kalrae* apresenta atividade citotóxica em linhagem de macrófago murino (RAW 264.7).

O extrato total de biofilme de *A. kalrae* apresenta maior atividade citotóxica em relação ao extrato total de células planctônicas de *A. kalrae*.

O extrato total de células planctônicas de *A. kalrae* apresenta maior atividade hemolítica em relação ao extrato total de biofilme de *A. kalrae*.