



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ROSANA SERPA

**BIOFILMES DE *Trichosporon asahii* e *Trichosporon inkin*: ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS, SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E INIBIÇÃO
MEDIADA POR RITONAVIR**

FORTALEZA - CE

2016

ROSANA SERPA

**BIOFILMES DE *Trichosporon asahii* e *Trichosporon inkin*: ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS, SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E INIBIÇÃO
MEDIADA POR RITONAVIR**

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.

Linha de pesquisa: Resistência à antimicrobianos.

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

FORTALEZA-CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

S495b Serpa, Rosana.
BIOFILMES DE *Trichosporon asahii* e *Trichosporon inkin*: ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS,
SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E INIBIÇÃO MEDIADA POR RITONAVIR / Rosana Serpa. – 2016.
122 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profª. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

1. Biofilmes. 2. *Trichosporon asahii*. 3. *Trichosporon inkin*. 4. Proteases. 5. Ritonavir. I. Título.

CDD 616.9

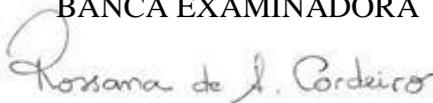
ROSANA SERPA

**BIOFILMES DE *Trichosporon asahii* e *Trichosporon inkin*: ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS, SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E INIBIÇÃO
MEDIADA POR RITONAVIR**

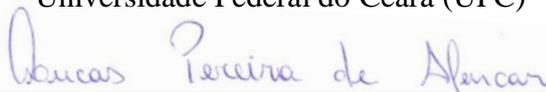
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 27/07/2016.

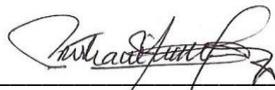
BANCA EXAMINADORA



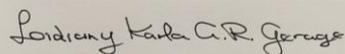
Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Lucas Pereira de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)



Prof. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico

*À minha mãe, que durante tantos anos da sua vida,
abdicou de seus próprios sonhos em favorecimento dos meus.*

AGRADECIMENTOS

Optei por deixar os agradecimentos como última etapa da confecção dessa tese. Não sei exatamente responder por qual motivo. Talvez estivesse ancorada na justificativa de não deixar ninguém importante de fora. E agora percebo que, instintivamente, foi uma maneira de postergar ao máximo a despedida. Este período no Ceará me premiou com tantos bons momentos e bons exemplos. Na vida, eu sempre fui uma pessoa privilegiada. Tive sorte de sempre cruzar meu caminho com boas pessoas. Tive sorte de poder fazer boas escolhas e delas extrair bons frutos. Engana-se quem pensa que nossos bons frutos são os títulos e as conquistas pessoais. Os títulos não são mais do que nossa obrigação. Nosso grande aprendizado se deu diariamente. Nas adversidades, na dificuldade, na saudade de casa, na solidão e no trabalho árduo diário. De fim de semana. Da madrugada. Juntos. Respeitando e aprendendo as diferentes culturas e realidades. Durante esses quatro anos, eu fui premiada com a convivência com muitas pessoas especiais, cada uma com sua particularidade. Nunca vou encontrar palavras suficientes pra agradecer o tanto que essas pessoas me fizeram bem. Talvez nem todas elas saibam o quanto são importantes pra mim.

Primeiramente, agradeço muito aos meus pais, mas agradeço em magnitude infinita à minha mãe, Josete Serpa. Não só por ter doado a si mesma como ela se doou por nós. Por mim, em especial. Mas por ter me mostrado o verdadeiro sentido do amor incondicional. E da batalha. E da vitória pessoal. E me mostrado que eu posso – e devo - ser exatamente quem eu quiser. Do jeito que eu quiser. Eu te amo, mãe!

Ao Andrew Gonzalez, meu querido, meu parceiro, meu maior exemplo de força, de parceria e de lealdade. Assumi essa empreitada como se fosse sua e todo dia me dá a força e a felicidade necessária pra mais um dia. A caminhada da minha vida é muito mais leve e divertida com o teu sorriso e teu apoio todo dia. Essa conquista não teria existido se tu não estivesse do meu lado.

Às duas grandes amigas-irmãs-parceiras de guerra, Patrícia Marcon e Fernanda Medeiros, que, mesmo de longe, me apoiaram, entenderam, incentivaram e seguraram tantas vezes durante esses 4 anos de distância (além de todos os outros anos, mesmo perto ou longe, sempre do mesmo jeito). Certas amizades não conhecem distâncias!

A CAPES, pelo apoio financeiro, ao CNPQ e FUNCAP pelo apoio financeiro aos projetos, e ao Centro Especializado em Micologia Médica e à Universidade Federal do Ceará pelo acolhimento e pela estrutura.

Em especial, agradeço à professora Rossana de Aguiar Cordeiro...por tudo! E nem assim seria suficiente! Agradeço à chefe pelo seu sorriso, pela sua dedicação extrema a cada um dos seus alunos diretos. E indiretos, também. Pela sua sala, que é fonte de aconchego e tranquilidade. Por tratar aos seus alunos de igual pra igual, por destinar seu tempo precioso em sentar com os alunos pra instigar pensamentos críticos, pra conversas na hora do café, pelas reuniões de resultados, pela discussão dos projetos que vão começar, e por nos incentivar a sermos melhores, o tempo todo, e não importa no quê. Pela proximidade genuína com os alunos, por seu tempo, por sua dedicação, por seu compromisso. Pela habilidade de me dar espaço pra desenvolver outras muitas atividade paralelas no laboratório com outros alunos e por confiar em mim. Por nos mostrar todo dia que somos profissionais competentes pra desenvolver nossas atividades docentes. Eu ainda poderia listar tantas outras qualidades. A senhora nos mostra na prática como se conquista o respeito. A admiração. O exemplo. E todo dia eu me espelho, e aprendo um pouquinho com a senhora a moldar o profissional exatamente do jeito que eu quero ser. Obrigada, chefe! De verdade.

À professora Raimunda Samia Nogueira Brilhante, pela dedicação extrema ao nosso PPGMM, à minha formação e ao nosso CEMM, por ter me recebido, e por todo dia batalhar pra que todos nós tenhamos as melhores condições possíveis de trabalho e aprendizado.

Ao professor Marcos Fabio Gadelha Rocha, pela dedicação, pela disponibilidade e pelo empenho em nos formar como profissionais competentes e capacitados, e em especial por ter feito parte da banca de qualificação.

Ao professor José Julio Costa Sidrim, que dedicou a vida para que não só eu, como inúmeros outros alunos do CEMM pudessem ter a estrutura de trabalho, ensino e aprendizagem que temos à disposição, além de ter destinado seu tempo pessoal em uma das minhas melhores disciplinas, e em conversas particulares, cujas quais me formaram como pessoa e profissional.

À professora Débora Castelo-Branco, uma pessoa iluminada e de coração grande. Obrigada pela ajuda, pela dedicação e pelo incentivo nos concursos! Obrigada, Débora, por destinar energia nos nossos projetos, na resolução dos problemas, pelos *insights* que tanto me ajudaram e pela proximidade com os alunos. Obrigada por ser um exemplo a ser seguido. Obrigada também por fazer parte importante da minha formação, nas bancas de Avaliação do Conhecimento e de Defesa.

Às professoras Cristiane Yumi Koga-Ito e Lidiany Karla Azevedo Rodrigues, pela disponibilidade em dedicarem seu tempo e energia ao meu trabalho, e por participarem com tanta disponibilidade da minha banca.

Aos professores Dr Zoilo Pires de Camargo, da Universidade Federal de São Paulo, e Dr Silvio Alencar Marques, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, pela gentileza de cederem as cepas utilizadas neste trabalho.

Agradeço a Carolinda de Oliveira, secretária do PPGMM, e a minha grande e verdadeira fada madrinha. A sua orientação, seu apoio e paciência tornaram estes anos, alguns dos melhores da minha vida. Seu nome retrata com verdade absoluta e inquestionável a sua alma. Obrigada, minha querida Carol.

Aos profissionais do nosso prédio que tornam nosso convívio tão agradável, como a querida Socorrinho Souza, a Aldenora Carvalho, a Claudinha Ribeiro, o Jaackson, o Wilis e o seu Valdenir, que sempre presenteiam meus dias com seus sorrisos.

Aos profissionais do nosso laboratório, Daniel Oliveira, Silviane Praciano, Terezinha Rodrigues e Glaucia Guedes, obrigada pela dedicação conosco e pelo compromisso de nos formar como bons profissionais. Meu agradecimento especial se estende à Silvi, pelo sorriso iluminado, pela dedicação aos alunos e pela habilidade inata de descomplicar as coisas. Por fim, se existe alguma pessoa **merecedora** da alcunha de vencedora na vida, é a Tetê. Minha querida Tetê! Sabe da importância de um abraço amigo, de uma palavra de apoio, e principalmente, do carinho que tem por nós e pelo seu papel no laboratório.

Aos demais professores do PPGMM, em especial à professora Lília Câmara, pelo exemplo de docência genuína, virtuosa, leve, e verdadeiramente construtora do conhecimento. À prof Cibele Carvalho, pela dedicação e por ter feito parte da banca de Avaliação do Conhecimento. À professora Tereza Bandeira, pelo acolhimento e pela maior demonstração de entusiasmo com a microbiologia.

Às minhas queridas Herlice Veras, Karol Santos, Marielle Pires, Barbara Silsan, Morgana Maria e Sabrynna Brito, e aos queridos Eliclécio Rodrigues e Christer Ocadaque, que alegraram muitas das minhas noites e almoços no RU, e em especial à Sabrynna, que me fez redefinir o significado das palavras superação e admiração.

Aos alunos da geração passada do CEMM, por toda a diversão e aprendizado. Em especial, agradeço ao Eduardo Cordeiro pela parceria e orientação, principalmente no início da minha caminhada. Ao Manoel Paiva, por ter sido um dos pioneiros na integração dos alunos e por ter dedicado tempo a ser um dos primeiros a discutir meus resultados. À Jakelyne Marques, por ter doado seu tempo a me orientar na entrada do doutorado, por ter participado ativamente da primeira etapa experimental desse trabalho, por ter me mostrado como se comportar com elegância diante das adversidades, por ter participado da minha banca de

qualificação, e acima de tudo, por me oferecer a sua amizade, seu sorriso, sua dedicação e seu respeito.

Aos meus queridos ICs, aos anteriores como a Camila Uchôa, a Gabriella Ribeiro e o Fernando Monteiro, que me proporcionaram tanto orgulho e tantos momentos divertidos. Aos ICs de hoje, meus adoráveis Jônatas Franco, Patrícia Mendes e Raquel Colares... Eu poderia descrever um mundo de motivos pelos quais vocês me orgulham, me inspiram e me alegam, todo dia. Eu poderia parabenizar pela força, pela dedicação, pela inteligência e pela vontade de vencer. Mas nem isso seria suficiente pra expressar o quanto vocês são importantes pra mim. O quanto eu me sinto privilegiada de trabalhar diretamente com vocês três e o quanto cada um de vocês me fez bem nesses anos de convívio. Continuem assim, todos vocês, meus queridos ICs, desse jeito, cada um de vocês! Sei que ainda vou ouvir falar muito bem de vocês!

Aos alunos recentes do CEMM, como a Giovana Riello, o David Caldas, Ramila Macedo, Aline Lobão, Charlline Melo, Natália Fechine, Erisvaldo Maia, Paula Bitencourt, Glautemberg Viana e demais alunos que me presentearam com sua convivência! Giovana, maravilhosa! Vou levar teu sorriso e tua simplicidade como exemplo pra todo o sempre! À todos que direta ou indiretamente auxiliaram na minha formação e na confecção dessa tese.

Aos amigos que compartilharam esses quatro anos comigo: Glaucia Guedes, Jonathas Sales, Lucas Alencar, Jamille Alencar e Antonio Evangelista. Glaucia entrou no CEMM na mesma semana que eu. E imediatamente, não sei exatamente porque, eu desenvolvi uma empatia pessoal muito grande contigo. Me vejo e me espelho em ti. Obrigada, Glaucia, pelos conselhos, pela conversa, pela força e por me mostrar que não precisamos estar o tempo todo juntos pra saber o verdadeiro valor da confiança. Jonathas, meu querido, é responsável por tantos dos meus sorrisos e gargalhadas! Meu exemplo de batalha, de superação e de busca pela própria felicidade. Lucas nos incentivou a desenvolver um espírito de equipe que não existia antes. Soube conduzir os alunos a discussões científicas, e despertou o interesse dos alunos para os trabalhos dos colegas, além de se mostrar um excelente profissional, com uma habilidade inata de me fazer enxergar o outro lado. Fui de muita sorte em ter tido a honra de te ter também como banca de defesa. Jamille, minha querida, me mostrou a definição de força, garra e superação dos desafios pessoais. As vezes ainda me questiono como podemos ser tão iguais e tão diferentes uma da outra. Obrigada pelo exemplo de superação, Jamille! E Tony, único aluno na história da pós-graduação no Brasil cuja IC fazia doutorado. Tony me levou do desespero de me deixar na mão à salvar a minha pele quando precisei! Tony,

obrigada pela parceria e pela paciência com meus ataques histéricos. Nicole terá um excelente exemplo em casa (e a sorte de ter a beleza da mãe!).

À nova geração do CEMM: Ana Luiza Aguiar, Edmilson Correia, Ewerton Caracas, Felipe Magalhães, Gleiciane Rocha, Jaime Acosta, Kleybson Sousa, Lana Glerieide, Livia Galdino, Lucilene Queiroz e Vandbergue Santos, e aos queridos ICs Thalita Oliveira, Juliana Maciel, Raissa Geovanna, Isis Menezes, Janaína Freire e Yago Brito. Eu teria inúmeros motivos para falar individualmente de cada um de vocês, o quanto eu sou grata pela agradável convivência e por ser presenteada com a companhia de vocês. Obrigada por abdicarem do tempo com suas famílias, por trocarem os rumos das suas vidas na pós-graduação, por passarmos mais tempo juntos que sozinhos, e por todo dia me presentarem com a leveza das suas palavras, com a gentileza de seus gestos, com a felicidade das risadas e com o grande companheirismo que a pós-graduação exige da gente. Seria injusto se eu agradecesse em especial a alguns de vocês, porque cada um tem características que me orgulham e me encantam do mesmo jeito, e cada um tem uma fatia especial da minha gratidão. Trabalhar com vocês, mesmo que alguns por pouco tempo, foi sem dúvida minha maior conquista! Aprender com suas culturas, reconhecer a importância de tantos profissionais de diferentes áreas e ver o quanto vocês crescem e evoluem todo dia me faz entender o motivo de ter escolhido a docência como estilo de vida. Aproveitem uns aos outros com sabedoria. Saibam crescer juntos. Aprendam que a ciência não é feita de indivíduos isolados. É feita de muitas cabeças curiosas, pensantes e atuantes. De muitos palpites e de muitas tentativas falhas. Aprendam que a docência se constrói na paciência, na dedicação diária e na ajuda ao próximo. Sejam felizes, meus amigos, e continuem me matando de orgulho, como todo dia da nossa convivência.

Obrigada por ter tido o privilégio de conviver com vocês esse tempo todo!

Obrigada por fazerem parte de anos muito felizes da minha vida!



MAFALDA, por Quino.

“No tiene importancia lo que yo pienso de Mafalda. Lo importante es lo que Mafalda piensa de mí.”

(Julio Cortázar, 1973)

RESUMO

Nos últimos anos, diversos estudos têm considerado os fungos do gênero *Trichosporon* como patógenos oportunistas emergentes em pacientes imunocomprometidos. Embora a dinâmica não seja bem compreendida, sabe-se que eventos associados à formação de biofilme nestes fungos têm papel importante no processo infeccioso. Desta forma, o presente estudo analisou aspectos morfofisiológicos dos biofilmes produzidos por *T. inkin*, bem como o papel de um inibidor de proteases sobre as células e biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*. Na primeira parte da pesquisa, foi investigada a formação de biofilmes de *T. inkin* (n=7) nos meios RPMI, Caldo CLED e Caldo Sabouraud, em pH 5,5 e pH 7,0, com inóculos iniciais de 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 células/mL, incubados a 28°C e 35°C, de forma estática ou agitação a 80 rpm, por 48h. Os biofilmes formados foram avaliados quanto à biomassa e atividade metabólica, contagem de células viáveis, quantificação de ácidos nucléicos e atividade proteásica. Investigou-se ainda a sensibilidade dos biofilmes frente à anfotericina B, caspofungina, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Para avaliação da atividade inibitória do ritonavir sobre a estrutura e o funcionamento dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, biofilmes foram formados na presença de ritonavir e avaliados quanto à adesão celular, desenvolvimento estrutural e atividade proteásica. Adicionalmente, o ritonavir foi avaliado sobre biofilmes maduros, composição de matriz e alterações estruturais. Células planctônicas de *T. asahii* e *T. inkin* (n=2 cada) também foram investigadas quanto à sensibilidade ao ritonavir isolado e em combinação com antifúngicos. Por fim, células planctônicas foram pré-expostas ao ritonavir e avaliadas quanto à capacidade de formação de biofilmes, sensibilidade a antifúngicos e alteração na hidrofobicidade de suas superfícies. A produção de biofilmes foi máxima em RPMI pH 7,0, em inóculo de 1×10^6 células/mL, e incubação a 35°C, sob agitação. Os biofilmes produzidos nessas condições são formados por comunidades dinâmicas, associadas a uma matriz extracelular, e mostram aumento da atividade metabólica e biomassa ao longo do tempo, atingindo estabilidade após 48 h de cultivo. Durante o desenvolvimento dos biofilmes, ocorre liberação de células viáveis e ácidos nucléicos para o ambiente circundante. Os biofilmes de *T. inkin* produzem mais proteases e toleram maiores concentrações de antifúngicos que as células planctônicas relacionadas. Dada à presença de proteases durante o desenvolvimento do biofilme de *T. inkin*, foi hipotetizado que essas enzimas poderiam ser consideradas alvos importantes no controle dos biofilmes. Os resultados mostraram que o ritonavir diminuiu a adesão celular e formação de biofilmes maduros, além de reduzir a atividade proteásica e alterar a estrutura dos biofilmes. O ritonavir não interferiu na atividade metabólica de biofilmes maduros, mas alterou a composição da matriz extracelular dos biofilmes, as quais apresentaram diferentes espectros protéicos em comparação com o grupo controle. O ritonavir inibiu o crescimento planctônico de *T. asahii* e *T. inkin* a 100 µg/mL. Entretanto, não foi observado sinergismo entre o ritonavir e os antifúngicos testados. Em células planctônicas, a pré-exposição ao ritonavir reduziu significativamente os valores de concentração inibitória mínima da anfotericina B em *T. asahii* e *T. inkin*, embora não tenha alterado a resposta aos azólicos. A pré-incubação com ritonavir reduziu a adesão das células, mas não a formação de biofilmes maduros, além de alterar a hidrofobicidade da superfície celular. O presente artigo detalhou características dos biofilmes de *T. inkin* e mostrou o potencial do uso de um inibidor de proteases no controle dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.

Palavras-chave: Biofilmes, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon inkin*, Proteases, Inibidor de proteases, Ritonavir.

ABSTRACT

In recent years, several studies have considered *Trichosporon* genus as emerging opportunistic pathogens in immunocompromised patients. Although the dynamics are not well understood, it is known that events associated with biofilm formation on these fungi play an important role in the infectious process. Thus, the present study analyzed morphophysiological aspects of biofilms produced by *Trichosporon* spp., as well as the role of a protease inhibitor on *T. asahii* and *T. inkin* cells and biofilms. In the first part of the study, we investigated the biofilm formation of *T. inkin* (n=7) in RPMI broth, CLED broth and Sabouraud broth at pH 5.5 and pH 7.0, with initial inoculum of 1×10^4 , 1×10^5 and 1×10^6 cells/ml, incubated at 28°C and 35°C in static or shaking at 80 rpm. Biofilms were evaluated for their biomass and metabolic viability, viable cell counts, quantification of nucleic acids and proteinase activity. It was also investigated the sensitivity of the biofilm front of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole and voriconazole. To evaluate the inhibitory activity of ritonavir on the structure and functioning of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms, biofilms were formed in the presence of ritonavir and evaluated for cell adhesion, structural development and proteinase activity. Additionally, ritonavir was assessed on mature biofilms, matrix composition and structural changes. Planktonic cells of *T. asahii* and *T. inkin* (n=2 each) were also investigated for sensitivity to ritonavir alone and in combination with antifungals. Finally, planktonic cells were pre-exposed to ritonavir and evaluated for biofilm formation capacity, susceptibility to antifungal agents, and changes in their surface hydrophobicity. Maximum biofilms growth in RPMI pH 7.0 for inoculation of 1×10^6 cells/ml and incubation at 35°C under stirring. Biofilms produced under these conditions are formed by dynamic communities associated with an extracellular matrix, and show increased viability and biomass over time, reaching stability after 48 hours of cultivation. During the development of biofilms occurs release of viable cells and nucleic acids into the surrounding environment. *T. inkin* biofilms produce more proteases and tolerate higher concentrations of antifungals that planktonic cells related. Due to the presence of proteases in the development of *T. inkin* biofilm, it was hypothesized that these enzymes could be considered important targets in controlling biofilms. The results showed that ritonavir decreased cell adhesion and formation of mature biofilms, and reduce protease activity and change the structure of biofilms. Ritonavir did not affect the viability of mature biofilms, but changed the composition of the extracellular matrix of biofilms, which showed different protein spectra compared to the control group. Ritonavir was able to inhibit planktonic growth of *T. asahii* and *T. inkin* approximately 50%. However, there was no synergism between ritonavir and tested antifungals. In planktonic cells, pre-exposure to ritonavir significantly reduced values of minimum inhibitory concentration of Amphotericin B in *T. asahii* and *T. inkin*, although not change the response to azoles. Preincubation with ritonavir reduced cell adhesion, but not the formation of mature biofilms, in addition to changing the hydrophobicity of the cell surface. The article detailed characteristics of *T. inkin* biofilms and showed the potential use of a protease inhibitor in controlling these biofilms.

Keywords: Biofilms, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon inkin*, Proteases, Protease inhibitors, Ritonavir.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1:** Micromorfologia celular e macromorfologia das colônias de *Trichosporon* sp. (A) seta aponta blastoconídeos; (B) setas apontam artroconídeos e hifas verdadeiras; (C) seta aponta pseudo-hifa. (D) Setas apontam ocorrência de apressório em *T. inkin*. Morfologia das colônias de (E) *T. asahii* e (F) *T. inkin* em ágar batata dextrose. (G) Prova de urease negativa (cor laranja) e positiva (cor rosa). (H) Setas apontam blastoconídeos e pseudo-hifas coradas com Calcoflúor; (I) Setas apontam hifas e hifas artroconidiadas coradas com calcoflúor. Fonte: elaborado pela autora. 24
- FIGURA 2:** Organograma de estruturação experimental deste estudo 41
- FIGURA 3:** Equação para determinação do Índice de Hidrofobicidade Superficial Celular em células pré-expostas ao RIT. 55
- FIGURA 4:** Formação de biofilmes de *T. inkin* (n=7) em diferentes condições de incubação. Meios de cultivo (A) Caldo CLED; (B) Caldo Sabouraud; (C) RPMI; Inóculo inicial de 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 células/mL. (D) Todos os meios de cultura. (E) Meios de cultura por pH testado. (F) Condições de incubação. Absorbâncias representa, a biomassa dos biofilmes. Agitação de 80 rpm. Letras diferentes representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão..... 57
- FIGURA 5:** Cinética de crescimento dos biofilmes de *T. inkin* (n=7). (A) Atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT. (B) Biomassa por coloração com cristal violeta. Letras diferentes representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão. 58
- FIGURA 6:** Microscopia Eletrônica de Varredura dos diferentes tempos de crescimento do biofilme de *T. inkin* CEMM 05-6-075. (A) 6 h de incubação, setas indicam as microcolônias; (B) 24 h de incubação; (C) 48 h de incubação (D) 72 h de incubação; Setas indicam as malhas de formação dos biofilmes em B e C. Setas indicam canais de circulação em D. Magnitude: 2000x. Barra: 50 μ m. 59

FIGURA 7: Liberação de células viáveis e ácidos nucléicos em sobrenadante de biofilmes de *T. inkin* (n=7). (A) Unidades formadoras de colônia por mililitro presentes nos sobrenadantes de cultivo dos biofilmes (barras cinza claro) e associadas aos biofilmes (barras cinza escuro). (B) Liberação de ácidos nucléicos em sobrenadante de biofilmes (barras cinza) e sobrenadante de crescimento planctônico (barras brancas). Letras diferentes representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão... 60

FIGURA 8: Análise ultraestrutural de biofilmes de *T. inkin*, após 72 h de incubação. (A) CEMM 05-6-057; (B) CEMM 05-6-086; (C) CEMM 01-1-144; (D) CEMM 01-1-143; (E) CEMM 01-1-145; (F) CEMM 05-6-074. Setas vermelhas indicam canais de passagem de água. Biofilme do isolado CEMM 05-6-057 em catéter fixado com azul de alcian (G) e sem azul de alcian (H). Biofilme do isolado CEMM 05-6-057 em laminas de vidro recobertas com Poli-L-Lisina e fixado com azul de alcian (I) e sem azul de alcian (J). Setas azuis indicam material extracelular. (A-H) Aumento de 2000 x. (I-J) Aumento de 8000 x. Barra A-H: 50 μ m. Barra I-J: 10 μ m.. 62

FIGURA 9: Detecção da atividade proteolítica por *T. inkin* (n=7) em cultivos planctônicos e em biofilmes. Letras diferentes representam diferença estatística significativa entre as condições ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão. 63

FIGURA 10: Inibição do crescimento de *T. asahii* e *T. inkin* na presença do RIT (barras cinzas) em concentrações de 25 a 200 μ g/mL. Controles sem o RIT (barras pretas). Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle de cada cepa ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão. 64

FIGURA 11: Atividade proteolítica em crescimento planctônico de *T. asahii* (A) e *T. inkin* (B) na presença de RIT a 100 μ g/mL (barras cinzas) e controle sem RIT (barras pretas). Os asteriscos representam diferença estatística em comparação ao controle de cada tempo ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão. 65

FIGURA 12: Porcentagem de adesão celular após 6 h de incubação. Atividade metabólica (A) e biomassa (B) na presença de 10 μ g/mL e 100 μ g/mL de RIT (barras cinzas) e controle sem RIT (barras pretas). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle de cada cepa ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão 66

FIGURA 13: Porcentagem de formação de biofilmes em 24 h de incubação (A-B) e 48 h de incubação (C-D) na presença de 10 µg/mL e 100 µg/mL de RIT (barras cinzas) e controle sem RIT (barras pretas). Atividade metabólica (A e C) e biomassa (B e D). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle de cada cepa ($p<0,05$). Resultados expressos por média ± desvio padrão 67

FIGURA 14: Imagens de microscopia confocal dos biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-073 (A a C) and *T. inkin* CEMM 05-6-075 (D a F) após 48 h de incubação, com seus respectivos gráficos de intensidade colorimétrica. Biofilmes desenvolvidos sem o RIT (A e D), com RIT a 10 µg/mL (B e E) e RIT a 100 µg/mL (C e F). Linhas verdes correspondem a células viáveis. Linhas vermelhas correspondem a células inviáveis. Magnitude: 40x. Barra: 100 µm. 68

FIGURA 15: Morfologia e ultraestrutura de biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-073 (A-C) e *T. inkin* CEMM 05-6-075 (D-F) após 48 h de incubação com co-incubação de RIT. Controles sem RIT (A e D), com RIT a 10 µg/mL (B e E) e com RIT a 100 µg/mL (C e F). As setas vermelhas indicam a destruição da estrutura dos biofilmes na presença do RIT a 100 µg/mL. Ampliação: 2000x. Barra: 50µm. 70

FIGURA 16: Sensibilidade dos biofilmes maduros ao RIT. AMB testada na concentração de 10x CIM. RIT a 10 e 100 µg/mL (barras cinzas) e controles sem as drogas (barras pretas). Asteriscos representam diferença estatística significativa em comparação ao controle ($p<0,05$). Resultados expressos por média ± desvio padrão 71

FIGURA 17: Atividade proteolítica durante a formação dos biofilmes (6 h, 24 h and 48 h) de (A) *T. asahii* (n=2) e (B) *T. inkin* (n=2), na presença de 10 e 100 µg/mL de RIT (barras cinzas) e controles sem RIT (barras pretas). Asteriscos representam diferença estatística em comparação ao controle em cada tempo ($p<0,05$). Asteriscos duplos representam diferença significativa entre os tratamentos correspondentes ($p<0,05$). Resultados expressos por média ± desvio padrão..... 72

FIGURA 18: Espectros de picos protéicos de matriz dos biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-073 (A e B) e *T. inkin* CEMM 05-6-075 (C e D). Controles (A e C) e tratamento com 100 µg/mL (B e D). Setas mostram os picos presentes somente na presença de RIT..... 73

FIGURA 19: Adesão celular após 6 h de incubação por células pré-expostas ao RIT nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL (barras cinzas), e sem RIT (barras pretas). Atividade metabólica (A) e biomassa (B). Asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação aos controles ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão 75

FIGURA 20: Formação de biofilmes em 24h (A e B) e 48h (C e D) de incubação, por células pré-expostas ao RIT nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL (barras cinzas), e sem RIT (barras pretas). Atividade metabólica (A e C) e biomassa (B e D). Asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação aos controles ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão 76

FIGURA 21: Hidrofobicidade celular superficial relativa de *T. asahii* e *T. inkin* após 14 dias de pré-exposição ao RIT a 10 µg/mL e 100 µg/mL (barras cinzas), e sem RIT (barras pretas). Asteriscos representam diferença significativa em relação aos controles ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão 77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Identificação e origem de isolamento das cepas de <i>Trichosporon</i> utilizadas neste estudo	40
TABELA 2: Valores de Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) de <i>T. inkin</i> (n=7) frente a anfotericina B (AMB), caspofungina (CAS), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ) e voriconazol (VRZ), em µg/mL	69
TABELA 3: Análise da intensidade colorimétrica e <i>Z-slice</i> dos biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> co-incubados com ritonavir	69
TABELA 4: Valores das concentrações inibitórias mínimas (µg/mL) dos antifúngicos frente a células de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> após a pré-exposição ao RIT a 10 µg/mL e 100 µg/mL durante 14 dias	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDR	<i>Candida drug resistance</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionária
FLZ	Fluconazol
ITZ	Itraconazol
KOH	Hidróxido de Potássio
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
RIT	Ritonavir
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
VRZ	Voriconazol
XTT	Sal de Tetrazólio – {2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H hidróxido de tetrazólio}
CIMB	Concentração Inibitória Mínima em Biofilme

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Gênero <i>Trichosporon</i>: características gerais e identificação	22
2.2 Infecções por <i>Trichosporon</i>	25
2.3 Fatores de virulência	27
2.4 Sensibilidade aos antifúngicos	30
2.5 Antivirais inibidores de proteases	34
3 PERGUNTAS DE PARTIDA	36
4 HIPÓTESES	37
5 OBJETIVOS	38
5.1 Objetivo geral	38
5.2 Objetivos específicos	38
6 MATERIAL E METODOS	39
6.1 Local do estudo	39
6.2 Microrganismos	39
6.3 Desenho experimental	40
6.4 Caracterização dos biofilmes de <i>T. inkin</i>	42
6.4.1 Formação de biofilmes	42
6.4.2 Cinética de crescimento dos biofilmes	43
6.4.2.1 Atividade metabólica e Biomassa	43
6.4.2.2 Dispersão de células viáveis	44
6.4.2.3 Liberação de ácidos nucleicos totais	44
6.4.3 Sensibilidade aos antifúngicos	45
6.4.3.1 Crescimento planctônico	45
6.4.3.2 Biofilmes	45
6.4.4 Morfologia ultraestrutural dos biofilmes	46
6.4.5 Atividade proteolítica total em biofilmes	47
6.5 Atividade inibitória do ritonavir	47
6.5.1 Sensibilidade de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> ao ritonavir	48
6.5.2 Interação com antifúngicos	48
6.5.3 Atividade proteolítica em crescimento planctônico	49
6.5.4 Co-incubação de ritonavir sobre biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	49

6.5.4.1	<i>Influência na adesão inicial dos biofilmes</i>	49
6.5.4.2	<i>Influência na maturação dos biofilmes</i>	50
6.5.4.3	<i>Morfologia e estrutura dos biofilmes</i>	50
6.5.4.4	<i>Sensibilidade de biofilmes maduros</i>	51
6.5.4.5	<i>Atividade proteolítica em biofilmes</i>	51
6.5.4.6	<i>Composição de matriz dos biofilmes</i>	52
6.5.5	<i>Pré-exposição de T. asahii e T. inkin ao ritonavir</i>	53
6.5.5.1	<i>Sensibilidade aos antifúngicos</i>	53
6.5.5.2	<i>Influência na adesão e formação dos biofilmes</i>	54
6.5.5.3	<i>Influência na hidrofobicidade celular</i>	54
6.6	<i>Análise Estatística</i>	55
7	<i>RESULTADOS</i>	56
7.1	<i>Caracterização dos biofilmes</i>	56
7.1.1	<i>Formação de biofilmes</i>	56
7.1.2	<i>Cinética de crescimento dos biofilmes</i>	57
7.1.2.1	<i>Dispersão de células viáveis e quantificação de ácidos nucleicos totais liberados</i>	59
7.1.3	<i>Sensibilidade planctônica e dos biofilmes aos antifúngicos</i>	60
7.1.4	<i>Morfologia ultraestrutural dos biofilmes de T. inkin</i>	61
7.1.5	<i>Atividade proteolítica total em biofilmes</i>	63
7.2	<i>Atividade inibitória do inibidor de protease ritonavir</i>	64
7.2.1	<i>Sensibilidade de T. asahii e T. inkin e interação com antifúngicos</i>	64
7.2.2	<i>Atividade proteolítica em crescimento planctônico</i>	64
7.2.3	<i>Efeito da co-incubação de ritonavir sobre biofilmes de T. asahii e T. inkin</i>	65
7.2.3.1	<i>Influência na adesão inicial dos biofilmes</i>	65
7.2.3.2	<i>Influência na maturação dos biofilmes</i>	66
7.2.3.3	<i>Morfologia e estrutura dos biofilmes</i>	67
7.2.3.4	<i>Sensibilidade de biofilmes maduros</i>	70
7.2.3.5	<i>Atividade proteolítica em biofilmes</i>	71
7.2.3.6	<i>Composição de matriz dos biofilmes</i>	72
7.2.4	<i>Pré-exposição de células de Trichosporon sp. ao ritonavir</i>	73
7.2.4.1	<i>Sensibilidade aos antifúngicos</i>	73
7.2.4.2	<i>Influência na adesão inicial dos biofilmes</i>	74
7.2.4.3	<i>Influência na formação dos biofilmes</i>	75
7.2.4.4	<i>Influência na hidrofobicidade celular</i>	76

8 DISCUSSÃO	78
9 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES	113
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

Trichosporon sp. são basidiomicetos leveduriformes amplamente distribuídos, que fazem parte da microbiota permanente do trato gastrointestinal, além de serem componentes da microbiota transitória da pele, mucosas e trato respiratório superior em humanos. Estas leveduras estão comumente associadas com infecções superficiais benignas denominadas piedra branca. Entretanto, em situações de desequilíbrio no hospedeiro, estes microrganismos podem evoluir de comensais para agentes de infecções sistêmicas. Infecções disseminadas por esse gênero estão comumente associadas a pacientes com doenças hematológicas malignas, e podem representar a segunda causa mais comum de infecções fúngicas nestes pacientes, superado apenas por *Candida* sp.

Dentre os fatores de virulência produzidos por este gênero estão a produção de enzimas extracelulares utilizadas para colonização e invasão tecidual, como proteases aspárticas, além da habilidade de formar biofilmes no hospedeiro e em dispositivos como catéteres. Células associadas em biofilmes apresentam características distintas de células de vida livre, que culminam em fenótipos de resistência aos antifúngicos, além da produção pronunciada de exoenzimas e aumento da virulência.

A produção de proteases está associada à formação de biofilmes fúngicos, deste modo, o desenvolvimento de estratégias que culminem na redução destes importantes fatores de virulência são de especial interesse, de modo que podem servir de alvo de atuação no desenvolvimento de novas drogas. A habilidade dos antivirais inibidores de proteases atuarem em fatores de virulência como adesão celular e produção de proteases em outras espécies fúngicas suscitou a possibilidade destes inibidores atuarem sobre a atividade proteolítica e formação de biofilmes de *Trichosporon*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Trichosporon*: características gerais e identificação

O gênero *Trichosporon* compreende fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, predominantemente leveduriformes, que estão amplamente distribuídos na natureza. Podem ser encontrados em diversos animais, além de substratos ambientais como água e solos de diferentes fontes, especialmente em áreas tropicais e temperadas (CHAGAS-NETO et al., 2008; COLOMBO et al., 2011; LAKSHMI; DAS, 2011; VAZQUEZ, 2010). No ambiente, podem atuar como produtores de compostos de interesse, assim como desempenhar papel importante em estratégias de controle biológico (KULAKOVSKAYA et al., 2010; LAKSHMI; DAS, 2011; LAKSHMI; DAS, 2013; MONTEIRO et al., 2011; SENTER et al., 2011). Chandran e Das (2010) reportaram que *T. asahii* isolado de solo contaminado com petróleo produziu um biosurfactante capaz de degradar óleo diesel. Esta mesma espécie foi associada à remoção efetiva de cafeína de dejetos descartados de indústrias cafeeiras (LAKSHMI; DAS, 2011). *T. cutaneum* apresenta a habilidade de degradar compostos fenólicos do ambiente como fonte de carbono (ALEXIEVA et al., 2008; GAAL; NEUJAHR, 1979; MORTBERG; NEUJAHR, 1985).

Leveduras do gênero *Trichosporon* pertencem à microbiota humana permanente do trato gastrointestinal, além de serem componentes da microbiota transitória da pele, mucosa orofaríngea e trato respiratório superior em humanos (CHAGAS-NETO et al., 2008; VAZQUEZ, 2010).

A primeira descrição de pedra branca em perucas de cabelo humano causada por *Trichosporon* foi realizada por Beigel no ano de 1865. Um ano mais tarde, Hallier nomeia o fungo como *Sclerotium beigelli*, em homenagem a Beigel (COLOMBO et al., 2011; SIDRIM; ROCHA, 2004; VAZQUEZ, 2010). A denominação de *T. beigelli* foi proposta em 1902, por Vuillemin, ao observar um quadro clínico de pedra branca em pelos de bigode (SIDRIM; ROCHA, 2004). Ao longo dos anos, o gênero *Trichosporon* correspondeu a uma coleção de diferentes fungos leveduriformes filogeneticamente distintos e *T. beigelli* era sua única espécie reconhecida (MARINÉ et al., 2015). Essa denominação se manteve em uso até recentemente quando Guého e colaboradores, em 1992, revisaram a taxonomia do gênero, extinguindo a espécie *T. beigelli* e reagrupando o gênero em seis espécies distintas (SIDRIM; ROCHA, 2004). Após análises moleculares, novas espécies foram sendo descritas e inseridas no gênero. Até o presente momento, este gênero é subdividido em cinco clados (Ovoides,

Cutaneum, Porosum, Gracile e Brassicae) que compreendem 51 espécies. De todas as espécies aceitas no gênero *Trichosporon*, 16 possuem relevância clínica, sendo *T. asahii*, *T. inkin*, *T. cutaneum*, *T. mucoides* e *T. ovoides* as principais espécies envolvidas (CHAGAS-NETO et al., 2008; DI BONAVENTURA, 2006; KRCMERY et al., 2002; MARINE et al., 2015; MENEZES et al., 2012; TAVERNA et al., 2014).

Na fase assexuada do ciclo biológico, fungos do gênero *Trichosporon* spp., caracterizam-se pela formação de blastoconídeos, artroconídeos, hifas verdadeiras septadas hialinas e pseudohifas (Figura 1 A-C e H-I). A fase sexuada é, até o momento, desconhecida (SUGITA et al., 2004). Algumas espécies possuem outras características morfológicas, úteis à identificação fenotípica, tais como apressórios (Figura 1D), sarcinas e células fusiformes gigantes (CHAGAS-NETO et al., 2008; SUGITA, 2004).

As colônias apresentam morfologia radial simétrica, de cor branca a creme, cremosas a secas, de lisas a cerebriformes, podendo ou não apresentar uma cobertura farinácea (Figura 1E-F). *Trichosporon* spp. apresentam uma grande variedade fenotípica inter e intraespecífica quanto a macromorfologia de suas colônias (SUGITA, 2004; MONTOYA; GONZALEZ, 2014; WALSH et al., 2004).

Quanto a identificação por métodos fisiológicos, todas as espécies assimilam diferentes carboidratos e outras fontes de carbono, entretanto, não apresentam crescimento como fermentadores. Uma importante característica do gênero *Trichosporon*, comum a outras leveduras basidiomicéticas patogênicas, é a habilidade de degradar uréia, como observado na figura 1G. Algumas espécies desse gênero mostram tolerância a cicloheximida, crescendo em meios de cultura suplementados com esse composto a 0,1% (CHAGAS-NETO et al., 2008; MIDDLEHOVEN, 2003; MONTOYA; GONZALEZ, 2014).

Métodos fenotípicos de identificação, baseados nas características macro e micromorfológicas das colônias e das células de *Trichosporon* são comumente utilizados para a identificação deste gênero. Entretanto, a identificação das espécies baseada em critérios fenotípicos pode apresentar divergências na identificação das mesmas espécies, em relação aos métodos moleculares (COLOMBO et al., 2011; KUSTIMUR et al., 2002; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). Métodos de identificação por galerias, como API 20C, ID 32C e VITEK, embora sejam de rápida execução, também apresentam falhas importantes na identificação de espécies de *Trichosporon* spp. (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005; RUAN et al., 2009; TAJ-ALDEEN et al., 2009).

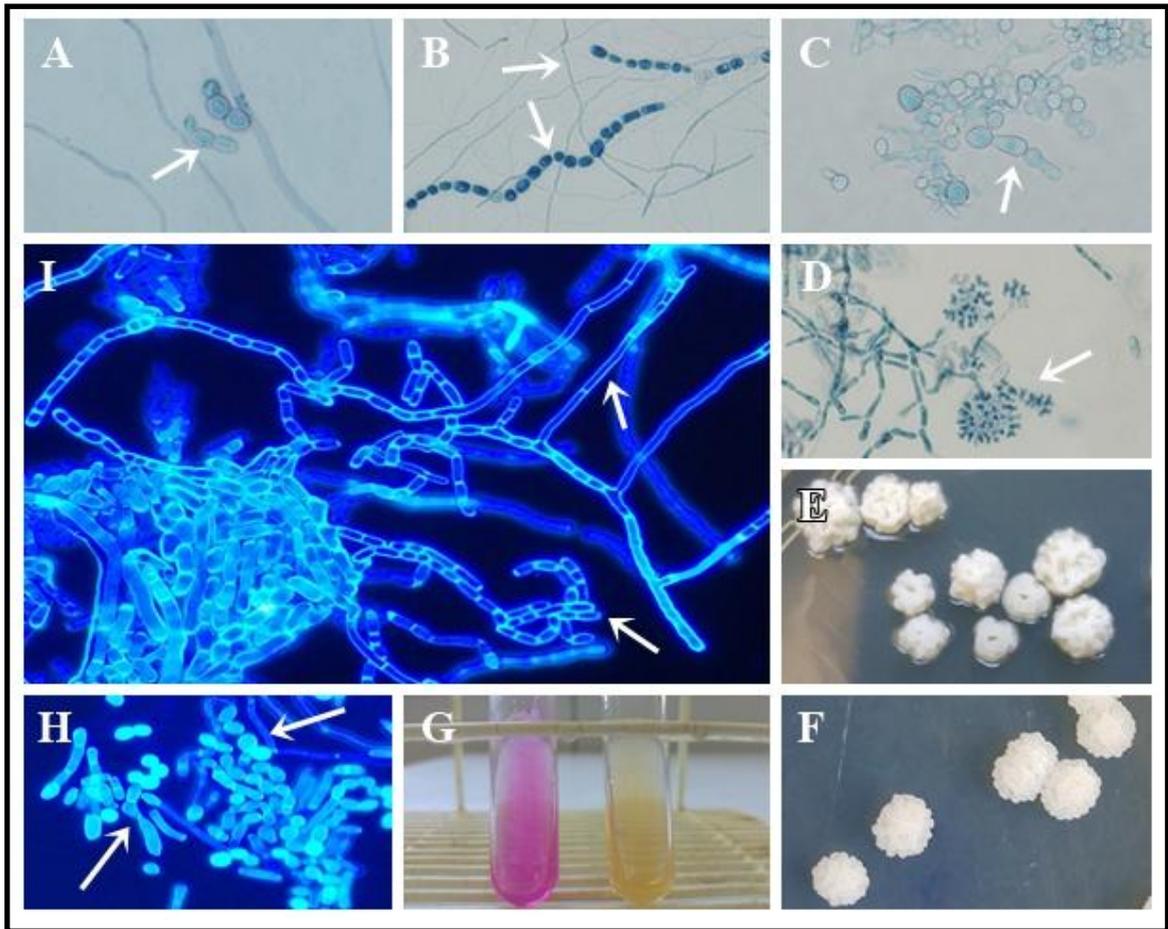


Figura 1: Micromorfologia celular e macromorfologia das colônias de *Trichosporon* sp. (A) seta aponta blastoconídeos; (B) setas apontam artroconídeos e hifas verdadeiras; (C) seta aponta pseudo-hifa. (D) Seta aponta ocorrência de apressório em *T. inkin*. Morfologia das colônias de (E) *T. asahii* e (F) *T. inkin* em ágar batata dextrose. (G) Prova de urease negativa (cor laranja) e positiva (cor rosa). (H) Setas apontam blastoconídeos e pseudo-hifas coradas com Calcoflúor; (I) Setas apontam hifas e hifas artroconidiadas coradas com calcoflúor. Fonte: elaborado pela autora.

Diversos autores sugerem que a identificação baseada em sequências ribossômicas, tais como a amplificação por PCR – (*Polymerase Chain Reaction*) associada ao sequenciamento de regiões intergênicas, são as mais indicadas para a identificação correta de espécies de *Trichosporon* (COLOMBO et al., 2011; EL MASHAD et al., 2011; GUO et al., 2011; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005; RUAN et al., 2009). Nesse contexto, genes ribossômicos representam alvos de regiões de conservação evolutiva consistentes, cujas regiões mais utilizadas são as ITS (*Internal Transcriber Spaces*) e IGS (*Intergenic spaces*) das subunidades 26S e 5S do RNA ribossômico (COLOMBO et al., 2011; GUO et al., 2011; MONTOYA et al.,

2015; SUGITA et al., 1999; SUGITA et al., 2002). Métodos recentes usam análises proteômicas como instrumento de identificação fúngica, como a utilização de espectrometria de massas para análise de perfis protéicos, como o MALDI-TOF (FOX et al., 2006; KOLECKA et al., 2013; MARKLEIN et al., 2009).

2.2 Infecções por *Trichosporon*

As micoses oportunistas têm aumentado nos últimos anos, e são consideradas um sério problema de saúde pública mundial, pois são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos (CHANG et al., 2003; KUHN et al., 2003). Paralelamente a este fato, têm se observado um aumento no surgimento de novas espécies de leveduras patogênicas consideradas emergentes. Embora *Candida* spp. seja ainda o patógeno fúngico mais isolado, a emergência de outras espécies fúngicas oportunistas, que antes eram consideradas apenas como comensais de microbiota ou contaminantes de meio de cultura, tem chamado a atenção dos pesquisadores nos últimos anos. Neste cenário, destacam-se os zigomicetos, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Malassezia*, *Saccharomyces* e *Trichosporon* (ABU-ELTEEN; HAMAD, 2012; MICELI et al., 2011). Dentre essas espécies, os organismos do gênero *Trichosporon* têm se destacado pela ocorrência de infecções disseminadas em pacientes com doenças hematológicas (DI BONAVENTURA et al., 2006; GIRMENIA et al., 2005; LIAO et al., 2015b; MICELI et al., 2011).

Trichosporon é o agente causador de piedra branca, uma infecção superficial benigna caracterizada pela ocorrência de nódulos brancos ou de cor creme, de consistência macia, fracamente aderidos ao cabelo e pêlos crurais e faciais. Piedra branca é uma doença de caráter cosmopolita, que atinge todas as faixas etárias, em áreas de clima tropical ou temperado e pode ser causada por diferentes espécies deste gênero (COLOMBO et al., 2011, MAGALHÃES et al., 2008; NORA et al., 2002). Além de piedra branca, outras infecções superficiais também estão associadas à *Trichosporon*, como as onicomicoses (CHAGAS-NETO et al., 2008; ORTEGA-SPRINGALL et al., 2015). Muitas dessas onicomicoses podem ser associadas aos dermatófitos ou outros agentes, entretanto, dependendo da área geográfica e das características da população acometida, *Trichosporon* pode ser o agente etiológico responsável por 10 a 40% destas infecções (CHAGAS-NETO et al., 2008; MARINE et al., 2015; RICHINI-PEREIRA et al., 2012).

T. asahii é a espécie mais comumente isolada de sítios anatômicos profundos em pacientes com tricosporonoses invasivas, além de estar também frequentemente associada à

infecções superficiais (BENTUBO; GOMPERTZ, 2014; LIAO et al., 2015b; MONTOYA et al., 2015). Além de *T. asahii*, dados epidemiológicos têm mostrado que *T. inkin* é a segunda espécie mais comumente associada a tricosporonoses invasivas, sendo isolada de uma grande variedade de amostras clínicas, como urina, catéteres e sangue (RIBEIRO et al., 2008; SILVESTRE et al., 2010).

Nos últimos anos, um número significativo de relatos tem confirmado a importância desse gênero como agente de infecções sistêmicas (LIAO et al., 2015b; MICELI et al., 2011; RUAN et al., 2009; WALSH et al., 2004). O gênero *Trichosporon* é responsável por aproximadamente 10% dos casos confirmados como infecções fúngicas invasivas, e de um modo geral, *T. asahii* têm sido a espécie mais comumente isolada. Entretanto, outras espécies têm sido associadas a infecções invasivas, como *T. inkin*, *T. mucoides*, *T. asteroides* e *T. ovoides* (DI BONAVENTURA et al., 2006; EL MASHAD et al., 2011; FONSECA, 2009; GUO et al., 2011; KUSTIMUR et al., 2002; LOPES et al., 1997; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005; TAVERNA et al., 2014; WALSH et al., 2004). Alguns trabalhos reportam que *T. inkin* é a segunda espécie mais isolada nesses casos (TAVERNA et al., 2014).

No Brasil, *T. inkin* foi isolado de catéter de paciente com transplante de medula óssea, além de estar presente em 17% de amostras de sangue e urina de pacientes hospitalizados (MORETTI-BRANCHINI et al., 2001; RIBEIRO et al., 2008). Silvestre et al. (2010), em 26 amostras de urina e quatro amostras de catéter de pacientes internados em UTI com diferentes doenças de base, mostraram que a espécie mais prevalente nas amostras de urina foi *T. asahii*, seguido de *T. inkin*. Dos quatro isolados de catéter, dois foram *T. asahii* e dois foram *T. inkin*.

Infecções invasivas por *Trichosporon* estão comumente associadas ao desequilíbrio fisiológico do hospedeiro, geralmente relacionado a doenças de base, como o imunocomprometimento, diabetes, queimaduras extensas, uso crônico de corticosteroides, dentre outras (GIRMENIA et al., 2005; MICELI et al., 2011; PEREIRA et al., 2009; RUAN et al., 2009). Fungemias por *Trichosporon* tem sido frequentemente associadas à doenças hematológicas malignas, em particular pacientes com leucemias e linfomas (GIRMENIA et al., 2005; SUZUKI et al., 2010). As razões para essa relação ainda não foram completamente elucidadas, entretanto, sabe-se que infecções por *Trichosporon* em pacientes com essas enfermidades apresentam taxas de mortalidade de até 80% (DI BONAVENTURA et al., 2006; FONSECA, 2009; LOPES et al., 1997; SUZUKI et al., 2010; WALSH et al., 2004).

As infecções sistêmicas por *Trichosporon* também são frequentemente associadas ao uso de catéteres e outros dispositivos invasivos (KUSTIMUR et al., 2002; MICELI et al., 2011; NETSVYETAYEVA et al., 2008; RUAN et al., 2009; SILVESTRE et al., 2010; TSAI

et al., 2012). Além destes dispositivos servirem como porta de entrada do microrganismo, a colonização da pele e do trato gastrointestinal atuam como reservatório desses patógenos (WALSH et al., 2004). Cho et al. (2015) mostraram que os genótipos ITS1 dos isolados de *Trichosporon* de infecções profundas são semelhantes ao encontrados na microbiota intestinal, provenientes de isolados de fezes. Esses resultados sugerem que os isolados que são colonizantes da microbiota intestinal podem estar associados ao desenvolvimento de infecções profundas.

2.3 Fatores de virulência

A virulência de um microrganismo pode ser expressa pelo número de mecanismos desenvolvidos para adesão, penetração e multiplicação de um patógeno no hospedeiro (BENTUBO; GOMPERTZ, 2014; COLOMBO et al., 2011; GACSER et al., 2007; MONTOYA et al., 2015). Diversos fatores de virulência têm sido relatados em *Trichosporon*. Recentemente, a produção de melanina foi descrita em *Trichosporon* sp. (CARVALHO et al., 2014). A ocorrência de *switching* fenotípico morfológico nas colônias, embora pouco estudada, foi relatada como um importante fator associado à adesão celular em *T. asahii* (ICHIKAWA et al., 2004). A produção de glucuronoxilomanana (GXM), além da produção de exoenzimas e a formação de biofilmes compõem o arsenal de virulência produzidos por *Trichosporon* (ANITHA et al., 2015; BENTUBO; GOMPERTZ, 2014; MONTOYA et al., 2015).

A melanina, um polímero hidrofóbico de alto peso molecular, pode ser produzida via diferentes compostos fenólicos, além de di-hidroxifenilalanina (DOPA), e já foi largamente relacionada à sobrevivência no ambiente e proteção contra o sistema imune do hospedeiro e a antifúngicos, principalmente em *Cryptococcus* spp. (NGAMSKULRUNGROJ; MEYER, 2009; VAN DUIN et al., 2002). A produção de melanina por *Trichosporon* sp. foi relatada recentemente, na presença do precursor L-DOPA, e acredita-se que esse achado possa estar associado à virulência em *Trichosporon* sp. (CARVALHO et al., 2014).

Outro fator de virulência de *Trichosporon* é a produção de glucoronaxilomanana (GXM), um polissacarídeo composto por manose, xilose e ácido glucurônico. A GXM, largamente estudada em *Cryptococcus neoformans*, é o componente majoritário da cápsula deste patógeno. A GXM produzida por *Trichosporon* spp. apresenta similaridades antigênicas e bioquímicas com a GXM de *C. neoformans*. Embora não esteja relacionado à produção de cápsula em *Trichosporon*, foi caracterizada como um importante componente de superfície

celular, altamente expressa em isolados causadores de tricosporonose sistêmica, além de ser associada à diminuição da resposta fagocítica de neutrófilos e macrófagos (COLOMBO et al., 2011; FONSECA et al., 2009; LYMAN et al., 1994; LYMAN et al., 1995; WALSH et al., 2004).

A produção de um complexo enzimático contribui positivamente no estabelecimento do parasitismo de hospedeiros suscetíveis, atuando como importante fator de virulência fúngica. A produção de enzimas permite a degradação de vários componentes teciduais do hospedeiro, auxiliando na invasão e obtenção de nutrientes (COLOMBO et al., 2011). Dentre as principais enzimas produzidas por *Trichosporon* sp. estão as proteases, fosfolipases, DNAses, lipases, esterases e hemolisinas (CAFARCHIA et al., 2008; GÁCSEK et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2012; MARINE et al., 2015; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2008; SUN et al., 2012; TAMURA et al., 2007). Bentubo e Gompertz (2014) sugerem que a produção de proteases e fosfolipases por *Trichosporon* foi mais eficiente na temperatura corporal, quando comparado à temperatura ambiente.

A produção de fosfolipases tem papel importante na invasão fúngica, pois permite a degradação de fosfolipídeos de membrana. Já as lipases e esterases são enzimas responsáveis pela hidrólise de triglicerídeos (SCHALLER et al., 2005). Bentubo e Gompertz (2014) mostraram que os isolados de *Trichosporon* sp. avaliados foram produtores de fosfolipases e lipases. As esterases são enzimas bem relatadas em *Trichosporon*, de modo que a quase totalidade dos isolados clínicos avaliados produziu esterases (ANITHA et al., 2015; DAG; CERIKCIOGLU, 2006; MONTOYA et al., 2015).

As desoxiribonucleases (DNAses) têm recebido atenção no gênero *Trichosporon* nos últimos anos. Relatos mostram que isolados clínicos de *Trichosporon* foram produtores de DNAses (BENTUBO; GOMPERTZ, 2014; MONTOYA et al., 2015). Ainda, Ichikawa et al. (2004) mostraram que *T. asahii* produziu β -N-Acetilhexosaminidases, que catalizam a hidrólise de N-acetil – hexosaminas, e podem estar envolvidas na patogenicidade fúngica pela degradação de oligossacarídeos do hospedeiro, como a N-acetil-glicosamina.

A produção e caracterização de proteases em *Trichosporon* tem sido relatada em leveduras isoladas de alimentos, com potencial deteriorante (GRONINGER; EKLUND, 1966; EKLUND et al., 1965; VORBECK; CONE, 1963). Segundo Mariné et al. (2015), a atividade proteolítica de *Trichosporon* pode ser atribuída como resposta adaptativa ao ambiente que estão inseridos, como a pele. Essas proteases apresentam um importante papel na superação de barreiras físicas e imunológicas do hospedeiro.

Montoya et al. (2015) mostraram que isolados clínicos de *Trichosporon* spp. foram produtores de proteases aspárticas. Bentubo e Gompertz (2014) também mostraram que metade dos isolados de *Trichosporon* sp. avaliados foram produtores de proteases. Embora as proteases desempenhem papel importante na virulência fúngica, pouco ainda se sabe sobre essas enzimas em *Trichosporon*. Proteases produzidas por *Trichosporon* já foram descritas como aspárticas, de modo que o pH ótimo de atividade é ácido (GRONINGER; EKLUND, 1966). De acordo com Schaller et al. (2005), em *Candida* spp., a atividade proteolítica é atribuída a expressão de uma família de, pelo menos, dez genes denominados SAP (*Secreted aspartic proteases*). Destas proteases, oito (SAPs 1-8) são secretadas para o meio extracelular, enquanto as SAP 9 e SAP 10 estão ancoradas na membrana celular. A produção de proteases em *Candida* tem sido extensamente estudada (NAGLIK et al., 2003). As proteases produzidas por *Candida* sp. apresentam perfis de atividade em diferentes pH, que podem ser essenciais para a sobrevivência e invasão do fungo em diferentes sítios do hospedeiro (NAGLIK et al., 2003; SCHALLER et al., 2005). A produção de proteases está relacionada à habilidade de estabelecer um processo infeccioso. Foi observado que isolados de lesões de mucosa oral produzem mais proteases que isolados de microbiota, não associados a processo infeccioso (SCHALLER et al., 2005).

Biofilmes são comunidades microbianas sésseis, aderidas à uma superfície biótica ou abiótica, cujas células encontram-se intimamente associadas e circundadas por uma matriz extracelular polimérica, apresentando características distintas, em comparação à células planctônicas (RAMAGE et al., 2012). A matriz extracelular apresenta grande multifuncionalidade química e espacial, pois além de preservar a viabilidade celular, a matriz está diretamente envolvida com as características mais importantes dos biofilmes: a resistência à resposta imune do hospedeiro e aos antimicrobianos (FLEMMING et al., 2007; RAMAGE et al., 2012; ZARNOWSKI et al., 2014). Uma característica fortemente associada à adesão celular e a formação de biofilmes é a hidrofobicidade superficial celular (BUJDÁKOVÁ et al., 2013). Dag e Cerikcioglu (2006) mostraram que isolados de *Trichosporon* apresentarem alta hidrofobicidade celular.

Quando associados em biofilmes, os microrganismos modulam a expressão de diversos genes relacionados ao metabolismo celular, de maneira distinta ao crescimento de vida livre. Dentre eles, a expressão de *agglutinin-like (ALS)* genes, associados à adesão ao hospedeiro, ocorre em células associadas em biofilmes. A expressão de proteínas que podem bloquear o sistema complemento do hospedeiro, além da síntese de moléculas específicas de *Quorum-sensing* e o aumento da dispersão de células viáveis para o meio externo são características

associadas à células em biofilmes (CHANDRA et al., 2001; GARCIA-SANCHEZ et al., 2004; GULATI; NOBILE, 2016).

Durante o desenvolvimento dos biofilmes, células fúngicas são continuamente dispersas para o meio externo, na forma de leveduras. Em biofilmes de *Candida*, células dispersas dos biofilmes apresentaram alta capacidade de formação de biofilmes e adesão celular, além de expressarem maior virulência em modelo murino de infecção (UPPULURI et al., 2010).

Células associadas em biofilme também apresentam uma maior produção enzimática, quando comparadas às células de vida livre (BRAGA-SILVA; SANTOS, 2011). Mendes et al. (2007) mostraram que células de *Candida* associadas em biofilme produziram mais enzimas proteolíticas do que células planctônicas. Nailis et al., 2010, mostraram o aumento da expressão de *SAP 5* e *SAP 6* em biofilmes de *Candida*.

Embora a formação de biofilmes em dispositivos invasivos seja de grande importância na relação parasita-hospedeiro, e alguns trabalhos relatem a formação de biofilmes por *Trichosporon* sp., pouco ainda se sabe sobre a dinâmica de formação, desenvolvimento e características morfofisiológicas dos biofilmes deste gênero (ALMEIDA et al., 2016; ANITHA et al., 2015; DI BONAVENTURA et al., 2006; DOSTALKOVA et al., 2015; ITURRIETA-GONZALEZ et al., 2014; JUNQUEIRA et al., 2012; LAKSHMI; DAS 2013; LIAO et al., 2014; LIAO et al., 2015; SUN et al., 2012; YANG et al., 2016).

Di Bonaventura et al. (2006) descreveram a habilidade de *T. asahii* aderir e formar biofilmes em superfícies de poliestireno e concluíram que a formação de biofilmes pode ser um fator determinante na persistência da infecção. Devido a patogênese da tricosporonose sistêmica estar intimamente relacionada com a presença de dispositivos médicos, sobretudo catéteres venosos centrais, vesicais e peritoneais, a capacidade de formação de biofilme nestes dispositivos é um importante fator de virulência que corrobora para o estabelecimento do processo infeccioso, sendo inclusive considerado uma forma de resistência microbiana (HASAN et al., 2009; KONTOYANNIS et al., 2004).

2.4 Sensibilidade aos antifúngicos

Atualmente, o tratamento das micoses limita-se a um pequeno grupo de classe de fármacos e diversos estudos reportam o fenômeno de resistência aos antifúngicos. As classes dos antifúngicos disponíveis são divididas basicamente pelo mecanismo de ação das drogas. Os derivados poliênicos, como exemplo a anfotericina B, atuam diretamente na membrana celular do fungo, ligando-se ao ergosterol, aumentando a permeabilidade da membrana

(THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009). Os derivados azólicos e alilaminas atuam inibindo a produção de ergosterol, que acarreta na síntese de esteróis tóxicos para a célula fúngica (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). O grupo das equinocandinas atua inibindo a produção de glucanos, um importante componente da parede celular do fungo (EMRI et al., 2013). A 5-flucitosina age na síntese de DNA e RNA e a griseofulvina inibe a mitose do fungo, atuando nos microtúbulos, impedindo o fuso mitótico (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Por fim, os derivados morfolínicos, assim como as alilaminas e os azólicos, também inibe a síntese de ergosterol pelo bloqueio de enzimas diferentes dos demais antifúngicos (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Estudos laboratoriais demonstram que muitos organismos do gênero *Trichosporon* são relativamente resistentes à anfotericina B. Há relatos de isolados de *T. asahii* naturalmente resistentes a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-flucitosina (CHAGAS-NETO, 2008). Paphitou et al. (2002) demonstraram que as concentrações inibitórias mínimas para o polieno testado foram relativamente elevadas quando comparadas aos azólicos, sugerindo uma superioridade dos azólicos em relação à anfotericina B, na eficiência do tratamento de *Trichosporon*. Os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência às drogas poliênicas compreendem em alteração na quantidade de esteróis de membrana celular, ocasionada pela superexpressão de genes que codificam para o ergosterol, ou na síntese de outros esteróis de membrana (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Diversos trabalhos avaliaram o perfil de resistência de diferentes espécies de *Trichosporon* a diversos antifúngicos (GARCIA-MARTOS et al., 2001; MENEZES et al., 2012). Lemes et al. (2010) mostraram a resistência de *T. asahii* e *T. asteroides* à anfotericina B, a 5-fluorocitosina e a itraconazol, além de mostrarem a sensibilidade destas espécies ao fluconazol. Li et al. (2010) demonstraram sinergismo entre anfotericina B e caspofungina contra *T. asahii*. Ruan et al. (2009) avaliaram a sensibilidade de isolados de *Trichosporon* sp. frente a nove drogas antifúngicas, e mostraram que os isolados apresentaram sensibilidade frente aos azólicos, em especial para voriconazol, mas equinocandinas não foram ativas frente a *Trichosporon*.

Este fenótipo de resistência em *Trichosporon* sp. pode estar associado a casos de infecção disseminada em pacientes durante ou pós-exposição aos antifúngicos (GOODMAN et al. 2002; RIEGER et al., 2007). Liao et al. (2012) reportaram um caso de terapia empírica com caspofungina e, passados 13 dias, *T. asahii* foi isolado de amostra de sangue deste paciente. Outros relatos revisados por este mesmo autor associam a ocorrência de tricosporonoses invasivas durante o tratamento profilático com equinocandinas, sendo em sua

maioria casos associados à pacientes com doenças hematológicas de base, como leucemia mieloide aguda e mielodisplasias.

De maneira geral, os mecanismos envolvidos no fenômeno de resistência aos antifúngicos em células associadas em biofilme são: aumento da densidade celular; estado fisiológico em que as células se encontram; presença de células persistentes; a matriz exopolimérica; aumento da expressão de genes relacionados aos alvos das drogas e a resistência mediada por bomba de efluxo (PARKER et al., 2014; RAMAGE et al., 2012).

O estado fisiológico em que as células fúngicas se encontram, quando em associação na forma de biofilme, desempenha papel fundamental na modulação da resistência aos antifúngicos, assim como o aumento da densidade celular que contribui para uma alteração na sensibilidade aos antifúngicos pelo biofilme, quando comparado às células planctônicas. Condições de estresse no ambiente que circunda o biofilme alteram sua estrutura e a sensibilidade aos antifúngicos. Esses mecanismos têm sido cada vez mais investigados, utilizando principalmente, espécies do gênero *Candida*, sobretudo *C. albicans* como modelo. Todavia, pesquisas com a mesma temática em biofilmes de *Trichosporon* são escassas (PETTIT; REPP; HAZEN, 2010; RAMAGE et al., 2012).

O ergosterol, um esterol de membrana que proporciona estruturação à célula fúngica, é um dos alvos principais dos antifúngicos de uso clínico humano (azólicos e polienos), e deste modo, alteração nesse sítio-alvo acarretam em aumento na resistência aos antifúngicos. Dessa maneira, a super-expressão ou mutação do gene *ERG11* alteram a produção do ergosterol, resultando no aumento da resistência de biofilmes fúngicos aos azólicos e polienos (PARKER et al., 2014; RAMAGE et al., 2012).

A resistência em biofilmes também pode ser mediada por bombas de efluxo, principalmente para os antifúngicos azólicos. Bombas de efluxo são proteínas de membrana que atuam ativamente transportando substâncias pela membrana para fora da célula. Em *C. albicans*, dois tipos principais de bombas de efluxo são expressos: bombas do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) que são codificadas pelos genes *CDR1*, *CDR2*, *CDR3* e *CDR4*, e as bombas do tipo MFS (*major facilitators superfamily*), codificadas pelo gene *MDR1*, as quais conferem resistência ao fluconazol. Um aumento da expressão destes genes, com respectivo aumento da atividade das bombas ABC e MFS acarretam na diminuição da concentração dos azólicos no interior celular, implicando no aumento da resistência a esses antifúngicos (KANAFANI; PERFECT, 2008; RAMAGE et al., 2012). Pouco se sabe ainda sobre os mecanismos de resistência aos azólicos expressos em *Trichosporon* sp. Kushima et al. (2012)

relacionaram o fenótipo de resistência ao fluconazol a uma mutação no gene *ERG11* em *T. asahii*.

A matriz extracelular do biofilme desempenha papel crucial na proteção das células fúngicas contra a resposta imunológica do hospedeiro, além de ser considerado um dos principais mecanismos de resistência aos antifúngicos. A matriz pode atuar como barreira física-química de proteção, e é composta de carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (FLEMMING et al., 2007; ZARNOWSKY et al., 2014), sendo estes últimos considerado como importantes componentes estruturais da matriz extracelular (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; MARTINS et al., 2010; MARTINS et al., 2011; NETT et al., 2008). Lakshmi e Das (2013) mostraram que a matriz de biofilmes de *T. asahii* é composta de exopolissacarídeos, além de ser visualizada na maturação dos biofilmes. Embora seja relatada a importância dos componentes de matriz na manutenção do fenótipo de resistência das células em biofilme, pouco se sabe sobre o papel dos ácidos nucleicos e de outros componentes de matriz na resistência de biofilmes de *Trichosporon*. Em *C. albicans*, o DNA presente na matriz é, em parte, proveniente de lise celular e, em parte, secretado ativamente pelas células, e desempenha importante papel estrutural e na manutenção da resistência das células aos antifúngicos (WHITCHURCH et al., 2002; WU, XI, 2009; MARTINS et al., 2010).

Di Bonaventura et al. (2006) avaliaram a produção de biofilme por *T. asahii* e mostraram que as células associadas em biofilme apresentaram resistência aos antifúngicos de uso terapêutico como anfotericina B, caspofungina e, sobretudo, aos derivados azólicos – fluconazol e voriconazol. O mesmo fenótipo de resistência de *Trichosporon* associado em biofilmes aos antifúngicos foi reportado por outros autores (ITURRIETA-GONZALEZ et al., 2014; LIAO et al., 2014; YANG et al., 2016). A ocorrência de sinergismo de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais e antifúngicos sobre biofilmes de *T. asahii* foi recentemente descrita (YANG et al., 2016). Combinações entre os antifúngicos voriconazol e anfotericina B com caspofungina foram sinérgicas sobre biofilmes de *T. asahii* (LIAO et al., 2014).

Compreender a dinâmica fisiológica que ocorre ao longo do desenvolvimento dos biofilmes, da síntese da matriz e da resistência dos biofilmes é o ponto chave para o desenvolvimento de alvos antifúngicos (RAMAGE et al., 2012; RIBEIRO et al., 2008).

2.5 Antivirais inibidores de proteases

Os fármacos antivirais inibidores de protease são peptídeos que se ligam competitivamente com o sítio de clivagem das enzimas aspartil proteases do vírus HIV, conduzindo à formação de partículas virais incompletas e não infecciosas (DEMARCHI et al., 2012; FLEXNER, 1998). Embora seja consenso entre os pesquisadores que o uso da terapia antiretroviral se reflita positivamente na diminuição das infecções fúngicas pelo reestabelecimento do Sistema Imune, muitos trabalhos têm mostrado uma diminuição na ocorrência de infecções fúngicas mesmo em pacientes que não apresentaram melhora geral na contagem de CD4+ (CASSONE et al., 2002; DEMARCHI et al., 2012; MIGLIORATI et al., 2004; SANTOS; BRAGA-SILVA, 2013). Muitos trabalhos sugerem que esta diminuição está associada à capacidade dos antivirais inibidores de proteases atuarem positivamente no controle do crescimento e na expressão de fatores de virulência pelos fungos (CASSONE et al., 1999, KORTING et al., 1999; ZEPELIN et al., 1999).

Diversos estudos mostram que os antivirais inibidores de proteases diminuíram a produção de proteases, urease e a produção de cápsula em *C. neoformans* (MONARI et al., 2005; SIDRIM et al., 2012), e diminuíram o crescimento fúngico, a diferenciação em hifas, o conteúdo de ergosterol celular, a capacidade de adesão celular, a produção de biofilmes e a produção de proteases por *Candida* sp. (BRAGA-SILVA et al., 2010; MATA-ESSAYAG et al., 2000; MELO et al., 2006; ZEPELIN et al., 1999). A diminuição da produção dessas proteases pode estar associada à diminuição da formação de biofilmes e, por conseguinte, no estabelecimento do processo infeccioso, de modo que as proteases tem papel importante neste contexto (BRAGA-SILVA; SANTOS, 2011).

A atividade dos antivirais sobre a diminuição da produção de proteases por *C. albicans* se dá pelo fato de que ambas proteases produzidas por esta espécie e pelo vírus HIV pertencerem à mesma grande superfamília de proteinases aspárticas (SAP), além de apresentarem o mesmo sítio catalítico (BEKTIC et al., 2001; MELO et al., 2006; SANTOS, 2010; SANTOS e BRAGA-SILVA, 2013; TSANG E HONG, 2009). Neste cenário, inibidores da protease podem ter um impacto diretamente nas aspartil proteases produzidas por *Candida* e outros fungos (KORTING et al, 1999; MONARI et al, 2005; MONOD et al., 1999).

Em estudo realizado por Asencio et al. (2005), o ritonavir exibiu um efeito discreto no crescimento, e ainda uma atividade inibitória significativa no consumo da albumina por *C. parapsilosis*, o que indiretamente indica a diminuição da atividade de proteases aspárticas.

Blanco et al. (2003) relataram a diminuição da atividade de proteases por *C. albicans*, além de diminuir a taxa de crescimento deste fungo. Cassone et al. (1999) mostraram que o ritonavir inibiu a produção e a atividade de proteases asparticas em *Candida*. Ainda, além de diminuir o crescimento de *Candida*, estes autores mostraram que o ritonavir exerceu um efeito terapêutico em modelo experimental de candidíase vaginal, similar ao fluconazol. Essas drogas podem ser consideradas como fármacos com potencial de atuação em diferentes alvos, não só em *Candida*, mas em outros fungos de interesse médico (ASENCIO et al., 2005; BRAGA-SILVA e SANTOS, 2011).

Eventos como a produção de proteases podem estar intimamente relacionadas não só à capacidade de formação e desenvolvimento de biofilmes por cepas do gênero *Trichosporon*, como também podem desempenhar papel importante na patogenia deste fungo. Estratégias que contemplem as proteases como alvo de atuação no controle destes fungos são de grande valia. Dada a habilidade dos antivirais inibidores de proteases atuarem nestes fatores de virulência em outras espécies fúngicas, é de grande interesse analisar o impacto dos antivirais inibidores de proteases sobre a formação, desenvolvimento e resistência de células planctônicas e de biofilmes produzidos por diferentes espécies de *Trichosporon*, de modo que biofilmes são alvos importantes de atuação para diminuição do estabelecimento, resistência antimicrobiana e recorrência destas infecções fúngicas.

3 PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Quais as condições físico-químicas ideais para formação de biofilmes por cepas clínicas de *Trichosporon inkin*?
2. Quais as principais características estruturais e fisiológicas dos biofilmes de *T. inkin* durante as etapas de formação, maturação e dispersão dos biofilmes?
3. As proteases extracelulares são produzidas em quais etapas do ciclo de desenvolvimento dos biofilmes de *T. inkin* ?
4. Qual o perfil de sensibilidade dos biofilmes de *Trichosporon* a antifúngicos de uso clínico?
5. Qual o impacto de um inibidor de proteases sobre as células planctônicas e no desenvolvimento dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* ?

4 HIPÓTESES

1. A formação de biofilmes por *Trichosporon inkin* é dependente das condições nutricionais, do pH e da temperatura de incubação;
2. Biofilmes de *T. inkin* são formados por diferentes morfotipos (blastoconídeos, artroconídeos e hifas) envoltos em matriz extracelular amorfa e liberam macromoléculas e células viáveis para o meio exterior;
3. As proteases são produzidas em mais de uma etapa do ciclo de desenvolvimento dos biofilmes de *T. inkin*;
4. Biofilmes de *T. inkin* toleram antifúngicos de uso clínico;
5. O inibidor de proteases deve alterar o desenvolvimento, a morfologia e a fisiologia de células planctônicas e de biofilmes de *Trichosporon*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Investigar os aspectos morfofisiológicos e o perfil de sensibilidade antifúngica dos biofilmes produzidos por *Trichosporon inkin*, bem como o efeito de um inibidor de proteases frente a células planctônicas e biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii*.

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar as melhores condições que otimizem a adesão celular e posterior desenvolvimento de biofilmes *in vitro* de diferentes isolados de *T. inkin*;
2. Investigar a cinética de formação dos biofilmes de *T. inkin* e a atividade proteolítica, bem como a liberação de células viáveis e ácidos nucléicos ao longo do desenvolvimento dos biofilmes;
3. Avaliar a sensibilidade dos biofilmes de *T. inkin* a determinados antifúngicos;
4. Determinar o efeito do ritonavir isolado e combinado com antifúngicos no crescimento planctônico, bem como na atividade proteolítica por *T. asahii* e *T. inkin*;
5. Avaliar o papel do ritonavir co-incubado durante o processo de adesão e maturação dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, além da sua atividade sobre biofilmes maduros, atividade proteolítica em biofilme, e impacto na composição da matriz e na morfologia destes biofilmes;
6. Analisar se a pré-exposição de células de *T. asahii* e *T. inkin* ao ritonavir altera a sensibilidade aos antifúngicos, na capacidade de adesão e formação de biofilmes, bem como na hidrofobicidade celular.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Local do estudo

Este estudo foi desenvolvido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). A análise do conteúdo protéico presente na matriz dos biofilmes foi realizada no Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, na Universidade Federal de Pernambuco, sob orientação do Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto. A análise topográfica dos biofilmes por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada na Central Analítica da UFC.

6.2 Microrganismos

Nesse estudo, foram avaliados isolados clínicos de *T. inkin* (n=7) e *T. asahii* (n=2). A tabela 1 apresenta a relação das cepas empregadas na pesquisa, bem como sua origem de isolamento e número de depósito da Micoteca do CEMM. A primeira parte experimental do trabalho, de caracterização dos biofilmes, foi realizada com sete cepas de *T. inkin*. A segunda parte experimental deste trabalho foi realizada com duas cepas de *T. asahii* e duas cepas de *T. inkin*, escolhidas aleatoriamente.

Os microrganismos foram recuperados em ágar Batata (Acumedia, EUA) por 48 h em 35°C. A identificação e pureza das cepas foi confirmada por testes fisiológicos, como assimilação de carboidratos, crescimento a 37°C e hidrólise de ureia, micromorfologia em ágar Malte (HIMEDIA, Brasil) (DE HOOG, 2000), além de sequenciamento da região IGS, usando os *primers* 26SF (5'-ATCCTTTGCAGACGACTTGA-3') e 5SR (5'-AGCTTGACTTCGCAGATCGG- 3') (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005).

Tabela 1: Identificação e origem de isolamento das cepas de *Trichosporon* utilizadas neste estudo.

Cepas	Espécie fúngica	Origem de isolamento
CEMM 05-6-086	<i>Trichosporon inkin</i>	Raspado de pele
CEMM 05-6-057	<i>Trichosporon inkin</i>	Cabelo com pedra branca
CEMM 05-6-074 (CBS* 5585)	<i>Trichosporon inkin</i>	Urina
CEMM 05-6-075	<i>Trichosporon inkin</i>	Área perigenital
CEMM 01-1-144	<i>Trichosporon inkin</i>	Pele
CEMM 01-1-143	<i>Trichosporon inkin</i>	Pele
CEMM 01-1-145	<i>Trichosporon inkin</i>	Urina
CEMM 05-6-072	<i>Trichosporon asahii</i>	Urina
CEMM 05-6-073	<i>Trichosporon asahii</i>	Catéter

*CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

6.3 Desenho experimental

Este trabalho foi organizado em duas etapas distintas. A primeira etapa consistiu na formação e caracterização morfofisiológica dos biofilmes produzidos por *Trichosporon*, empregando *T. inkin* como modelo de estudos. De acordo com os resultados encontrados nesta primeira etapa, a segunda etapa constituiu da análise do efeito de um inibidor de proteases sobre a morfologia e fisiologia das células e biofilmes produzidos por *T. asahii* e *T. inkin*. As análises das duas etapas experimentais foram conduzidas conforme o desenho experimental apresentado na figura 2.

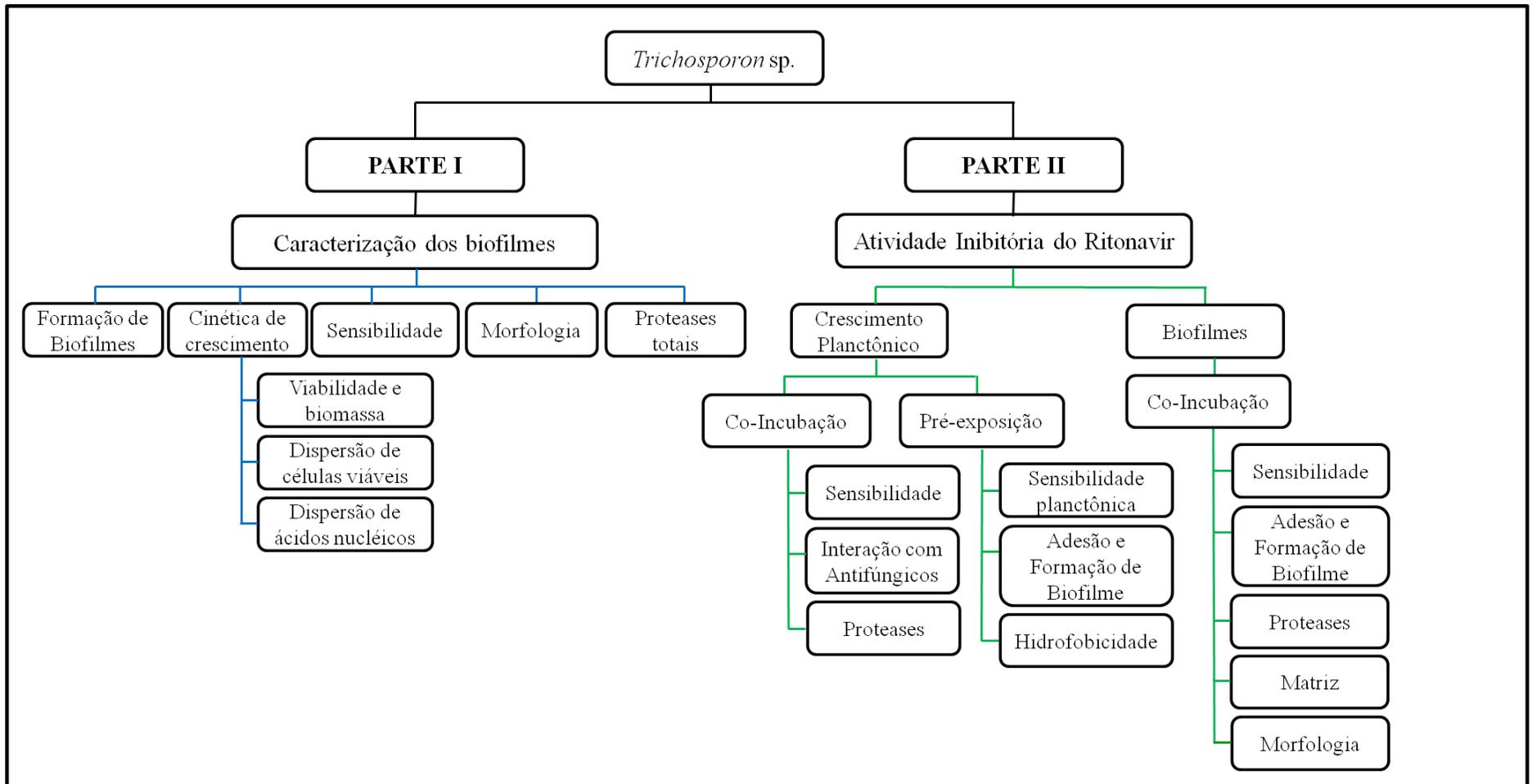


Figura 2: Organograma de estruturação experimental deste estudo.

1ª PARTE EXPERIMENTAL

6.4 Caracterização dos biofilmes de *T. inkin*

6.4.1 Formação de biofilmes

A habilidade de formação de biofilme em diferentes meios e condições de cultivo foi avaliada em microplacas de poliestireno de fundo chato como substrato de adesão celular, segundo Di Bonaventura et al. (2006), com modificações. Nesta primeira parte experimental, foram avaliados os sete isolados clínicos de *T. inkin*. Os isolados de *T. inkin* (n=7) foram incubados em ágar Batata a 35°C durante 48 h. Os inóculos foram ajustados em três concentrações celulares iniciais (1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 células/mL), por contagem em câmara de Neubauer, diretamente em três diferentes meios de cultivo: RPMI 1640 (Sigma, St. Louis) tamponado com 0,165 M de tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico - Sigma, St. Louis), Sabouraud Dextrose Caldo 4% (HIMEDIA, Brasil) e Caldo Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos (CLED), todos eles ajustados para pH 5,5 e pH 7,0.

Cada cultivo foi incubado a 25°C e a 35°C, ambos sob agitação de 80 rpm e estáticos. Para cada combinação de inóculo e meio de cultivo, alíquotas de 200 µL foram dispostas nas placas de microdiluição. As placas foram incubadas por 6 horas, tempo de adesão das células no substrato. Passado esse período, os meios foram aspirados e as placas foram gentilmente lavadas com *Phosphate Buffer Solution* (PBS) com Tween 20 (0,05% v/v), pH 7,0, estéril para a remoção de células não aderidas. As placas foram preenchidas com os respectivos meios estéreis, e posteriormente incubadas para a etapa de maturação dos biofilmes, até o período máximo de 72 h de incubação (DI BONAVENTURA et al, 2006).

A capacidade de formação de biofilmes foi avaliada pela técnica de coloração por cristal violeta. Após o período de incubação de 72h, os meios de cultivo foram removidos e os poços das microplacas foram gentilmente lavados com PBS-Tween 20 estéril por duas vezes. Após, os biofilmes foram desidratados com metanol (Dinamica, Brasil) por aproximadamente 5 min. O metanol foi removido, e as placas foram secas dentro da cabine de fluxo laminar. Após, foram adicionadas alíquotas de 200 µL de cristal violeta a 0,3%. Passados 20 min de incubação, o corante foi removido e as placas foram gentilmente lavadas com água destilada estéril por duas vezes. Após as lavagens, o corante impregnado nos biofilmes foi removido dos poços das microplacas com a adição de 200µL ácido acético:água 33% (v/v) durante 30 segundos. Após este período, o sobrenadante foi transferido para novas placas de

microtitulação de fundo chato, e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 590 nm (PEETERS et al., 2008). Todas as condições foram testadas para todos os isolados (n=7) de *T. inkin*, em triplicata. O meio de cultivo associado a condição de incubação que apresentasse maior absorvância a 590 nm foi definido como metodologia de formação de biofilme para as etapas posteriores deste trabalho.

6.4.2 Cinética de crescimento dos biofilmes

Para a análise da cinética de desenvolvimento dos biofilmes, os isolados de *T. inkin* (n=7) foram previamente cultivados em ágar Batata por 48 h a 35°C. Os biofilmes foram formados com inóculo inicial de 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS em pH 7,0 e incubados a 35°C sob agitação de 80 rpm. Passadas 6 h de incubação (tempo de adesão celular), os sobrenadantes dos biofilmes foram aspirados, os poços foram lavados com PBS com Tween 20 (0,05% v/v) estéril (DIBONAVENTURA et al., 2006), e novamente preenchidos com RPMI 1640 tamponado com MOPS estéril. As placas foram novamente incubadas até o tempo final de 72 h de incubação. Para as análises de atividade metabólica e biomassa, foram avaliados os tempos de 6 h, 24 h, 48 h e 72 h de cultivo. Já para as análises de liberação de células viáveis e de ácidos nucléicos, foram avaliados os tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Todos os isolados foram analisados em triplicata.

6.4.2.1 Atividade metabólica e Biomassa

Para cada tempo de análise (6 h, 24 h, 48 h e 72 h), os sobrenadantes de cultivo dos biofilmes foram aspirados e desprezados, e os poços foram lavados com PBS-Tween 20 para a remoção de resíduos de células não aderidas. A biomassa dos biofilmes nos diferentes tempos foi determinada pela coloração do cristal violeta, conforme descrito no item 6.4.1 (pag. 42).

A análise da atividade 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), segundo Martinez e Casadevall (2006), com modificações. Após as lavagens, todo PBS foi cuidadosamente retirado e os poços das placas contendo os biofilmes foram preenchidos com 50 µL de PBS estéril, 75 µL da solução de XTT estéril (1 mg/mL em PBS – Sigma, USA) e 6 µL da solução de menadiona (1 mM em acetona - Sigma, USA). Todo o processo foi realizado ao abrigo da luz direta. As

placas foram incubadas por 5 horas, também ao abrigo da luz e a 35°C. Após o período de incubação, a solução de XTT foi transferida para novos poços de fundo chato e as placas foram lidas em espectrofotômetro a 492 nm. A atividade metabólica dos biofilmes foi medida pela atividade das desidrogenases mitocondriais, que reduzem o XTT a formazan, resultando em uma mudança colorimétrica (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

6.4.2.2 Dispersão de células viáveis

Para análise da ocorrência da dispersão de células viáveis do biofilme no sobrenadante ao longo do tempo, foram realizadas contagens do número de UFC/mL presentes nos sobrenadantes de cultivo e também do número de UFC/mL associadas aos biofilmes em 24 h, 48 h e 72 h de incubação. A cada tempo de análise, os sobrenadantes de cultivo dos biofilmes foram cuidadosamente aspirados e colocados em microtubos. Os poços dos biofilmes foram preenchidos com 200 µL de PBS-Tween 20, raspados dos poços com o auxílio de ponteiros estéreis e coletados em outros microtubos. Ambos sobrenadantes e células dos biofilmes foram vigorosamente agitados em vortex, diluídos adequadamente em solução salina, e alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de ágar Batata. As placas foram incubadas a 35°C por 48 h, e as colônias foram contadas, para determinação do número de UFC/mL presente nos sobrenadantes de cultivo e também o número de UFC/mL associados aos biofilmes. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.4.2.3 Liberação de ácidos nucléicos totais

A dispersão de ácidos nucléicos nos sobrenadantes de crescimento dos biofilmes foi avaliada em 24 h, 48 h e 72 h de incubação. A cada tempo de cultivo, os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados e coletados para microtubos. Após a coleta, os sobrenadantes foram centrifugados a 9.167 g durante 10 min. Após a centrifugação, alíquotas de 50 µL foram coletadas dos sobrenadantes. A quantificação de ácidos nucléicos nos sobrenadantes foi realizada por leitura em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) a 260 nm. Ainda, as mesmas análises de liberação de ácidos nucléicos foram realizadas em cultivos planctônicos, com inóculo inicial de 1×10^6 células/mL, cultivados em meio RPMI a 35°C a 80 rpm, durante os mesmos tempos de análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

6.4.3 Sensibilidade aos antifúngicos

6.4.3.1 Crescimento planctônico

O perfil de sensibilidade de *T. inkin* (n=7) em crescimento planctônico foi realizado conforme o documento M27-A3 (CLSI, 2008), pela técnica de microdiluição em caldo em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS em pH 7,0. Os antifúngicos utilizados foram anfotericina B (AMB - Sigma, USA), caspofungina (CAS - Merck, EUA), fluconazol (FLZ - Pfizer, Brasil), itraconazol (ITZ - Janssen Pharmaceutical, Belgica) e voriconazol (VRZ - Pfizer, Brasil). AMB, ITZ e VRZ foram testados de 0,031 – 16 µg/mL. CAS foi testada de 0,015 – 8 µg/mL e FLZ foi testado de 0,125 – 64 µg/mL. Os isolados foram previamente semeados em ágar batata e incubados a 35°C por 48 h. A partir destas colônias, células foram ressuspendidas em salina estéril até atingirem a escala 0,5 de McFarland. A partir desta suspensão, foram feitas diluições 1:50 e depois 1:20 em meio RPMI tamponado com 0,165 M de MOPS em pH 7,0. Alíquotas de 100 µL do inóculo final foram adicionadas às placas já contendo 100 µL de RPMI acrescidos das drogas em concentrações dobradas. As placas foram então incubadas a 35°C por 24 h para leitura de CAS, e de 48 h para os demais antifúngicos.

As leituras das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) das drogas foram determinadas pela redução de 50% do crescimento visível para antifúngicos azólicos e CAS, e ausência de crescimento visível para AMB (CLSI, 2008). *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi incluída como controle de qualidade.

6.4.3.2 Biofilmes

O perfil de sensibilidade dos biofilmes de *T. inkin* (n=7) foi realizado conforme Di Bonaventura et al. (2006), com modificações. Os antifúngicos utilizados foram AMB, CAS, FLZ, ITZ e VRZ. Os biofilmes foram formados como descrito no item 6.4.2 (pag. 43), e incubados durante 48 h. Após a incubação, os sobrenadantes foram removidos, os biofilmes foram lavados com PBS-Tween 20 e então foram preenchidos com alíquotas de 200 µL de RPMI contendo os antifúngicos em concentrações que variaram de 8 – 128 µg/mL. As placas foram reincubadas a 35°C, e as leituras foram realizadas em 24 h para caspofungina e 48 h para os demais antifúngicos.

As leituras foram realizadas pelo ensaio de redução do XTT, conforme descrito no item 6.4.2.1 (pag. 43). A concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) para CAS e azólicos foi definida como a menor concentração capaz de diminuir 50% da atividade metabólica dos biofilmes, em comparação ao controle sem os antifúngicos (LIAO et al., 2014). Para AMB, a CIMB foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% da atividade metabólica dos biofilmes (DI BONAVENTURA et al., 2006). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

6.4.4 Morfologia ultraestrutural dos biofilmes

A análise da morfologia celular e ultraestrutural dos biofilmes produzidos por *T. inkin* (n=7) foi realizada pela microscopia eletrônica de varredura, de acordo com Di Bonaventura et al. (2006). Os biofilmes foram formados conforme descrito no item 6.4.2 (pag. 43), diretamente sobre laminae ImmunoSlides® (EasyPath, Brasil) esterilizadas recobertas com Poli-L-Lisina. Adicionalmente, outros biofilmes foram formados em fragmentos de catéter estéreis, para avaliação da formação de biofilmes neste tipo de dispositivos. Para tanto, foram utilizados fragmentos de 0,5 cm de catéteres, incubados imersos nos inóculos nos poços das microplacas, conforme já previamente descritos. As imagens foram realizadas em 6 h, 24 h, 48 h e 72 h de cultivo dos biofilmes. Após cada período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e os biofilmes foram imersos em uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15M (pH 7,4) a 4°C *overnight*.

Para avaliar a presença de matriz associada aos biofilmes, duas amostras de biofilmes, uma em lamina de vidro recoberta com Poli-L-lisina e outra em catéter foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato com o corante catiônico azul de alcian (0,1%) e incubado *overnight* a 4°C. Os biofilmes foram lavados por duas vezes com tampão cacodilato 0,15M e desidratados com lavagens seriadas em etanol em concentrações ascendentes (50%, 70%, 80%, 95% e 100%, com incubação de 10 min, por duas vezes cada. Após as lavagens, as laminae foram secas em estufa por 10 min e recobertas com hexametildisilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 min, e após a retirada do hexametildisilazano, foram secas em dessecador por 24 h. As lâminas foram cobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em Microscópio Eletrônico FEI Inspect S50, em alto vácuo a 15kV. As imagens foram processadas em *software Photoscape*, v3.6.5 (MooiiTech, Korea).

6.4.5 Atividade proteolítica total em biofilmes

A detecção da produção de enzimas proteolíticas em crescimento planctônico e em biofilmes de *T. inkin* (n=7) foi realizada conforme Charney e Tomarelli (1947), com modificações descritas em Cordeiro et al. (2016). Para a análise no crescimento planctônico, foram feitas suspensões de células na concentração de 1×10^6 células/mL diretamente em 20 mL de meio RPMI tamponado com MOPS em pH 7,0. Os isolados foram então incubados a 35°C em agitação de 80 rpm, durante 3 dias. Para a análise da atividade proteolítica em biofilmes, os mesmos foram montados de acordo com o item 6.4.2. A primeira análise foi realizada com 6 horas de incubação para ambas as condições. Posteriormente, foram feitas análises em 24 h, 48 h e 72 h de incubação.

Para cada tempo de análise, 1,5 mL dos cultivos tanto planctônico quanto do sobrenadante de cultivo mais biofilme raspado da placa foram coletados e centrifugados a 9.167 g durante 10 min. Um volume de 1 mL dos sobrenadantes foi coletado e adicionado a 1 mL de uma solução de azoalbumina (0,3% diluída em uma solução de bicarbonato de sódio a 1%), e então o volume final de 2 mL foi incubado em banho-maria a 37°C por 3 horas. Passado esse período, a reação enzimática foi parada com a adição de 8 mL de ácido tricloroacético a 5%. Alíquotas de 2 mL foram centrifugadas a 9.167 g por 10 min, e 1 mL do sobrenadante foi retirado e colocado em 1 mL de uma solução de NaOH a 0,5 M. Após a passagem no vórtex, essa solução final foi lida em espectrofotômetro a 440nm. A contagem de UFC/mL presente nos biofilmes com os sobrenadantes e no crescimento planctônico foi realizada conforme descrito no item 6.4.2.2 (pag. 44). A atividade proteolítica foi expressa como a razão entre as absorbâncias e o número de log de UFC/mL. O controle negativo e branco do espectrofotômetro foram realizados da mesma maneira que os testes, porém sem a inoculação do microrganismo. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

2ª PARTE EXPERIMENTAL

6.5 Atividade inibitória do ritonavir

A atividade inibitória do ritonavir foi avaliada em duas cepas de *T. asahii* (CEMM 05-6-072 e CEMM 05-6-073) e duas cepas de *T. inkin* (CEMM 05-6-075 e CEMM 05-6-074). O

ritonavir (RIT - Norvir, Abbott, EUA) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 mg/mL e mantido a -20°C até o momento do uso. A concentração de DMSO testada foi de no máximo 1% no volume final, sem interferência comprovada de atividade. As concentrações de RIT testadas foram baseadas na concentração de pico plasmático da droga, de 10 µg/mL (FLEXNER et al., 1998).

6.5.1 Sensibilidade de *T. asahii* e *T. inkin* ao ritonavir

A atividade inibitória do RIT frente a *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008). O RIT foi testado na concentração de 25 a 200 µg/mL. O perfil de sensibilidade dos isolados aos antifúngicos AMB, FLZ, ITZ e VRZ foi testado conforme descrito no item 6.4.3 (pag. 45). As placas foram incubadas por 48 h a 35°C. A leitura dos pontos de corte dos antifúngicos foi realizada conforme descrito no item 6.4.3 (pag. 45). Para a determinação da atividade inibitória do RIT, as placas foram homogeneizadas e transferidas para placas de fundo chato. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade antifúngica foi expressa em porcentagem de inibição em comparação ao controle sem o RIT (MELO et al., 2006). Todos os testes foram conduzidos em duplicata.

6.5.2 Interação com antifúngicos

A ocorrência de interação entre o RIT e os antifúngicos AMB, FLZ e ITZ a *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) foi realizada pelo método de tabuleiro de xadrez em microdiluição em caldo, como proposto por Odds (2003). RIT foi testado nas concentrações que variaram de 3.125 a 200 µg/mL, associados às concentrações de AMB (0,0039 – 4 µg/mL), FLZ (0,0078 - 8 µg/mL) e ITZ (0,0004 – 0,5 µg/mL). Após 48 h de incubação a 35°C, as placas foram homogeneizadas, transferidas para microplacas de fundo chato e lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores de CIM para cada antifúngico e para o RIT foram determinados de acordo com o CLSI (2012).

A interação entre as drogas foi calculada pelo ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada), dado pela soma das concentrações combinadas divididas pelas concentrações isoladas do RIT e de cada ATF, conforme a . Para a ocorrência de sinergismo, foram considerados os seguintes parâmetros: $ICIF \leq 0,5$: Sinergismo, $ICIF > 4,0$:

Antagonismo e $0,5 < ICIF > 4,0$: Sem interação (ODDS, 2003). Todos os testes foram conduzidos em duplicata.

6.5.3 Atividade proteolítica em crescimento planctônico

A influência do RIT na atividade proteolítica total em crescimento planctônico dos isolados de *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) foi avaliada na concentração de 100 µg/mL. A atividade proteolítica total foi analisada utilizando a azoalbumina como substrato, conforme Charney e Tomarelli (1947), modificado por Cordeiro et al. (2016). Inóculos iniciais de 1×10^6 células/mL foram incubados em meio RPMI tamponado com MOPS a 0,165 M em pH 7,0, com RIT a 100 µg/mL e sem a presença do RIT foram incubados a 35°C e 80 rpm durante 72 h.

A cada tempo de análise (6 h, 24 h, 48 h e 72 h) alíquotas foram coletadas e centrifugadas a 9.167 g durante 10 min. Volumes de 1 mL foram misturados com igual volume de azoalbumina a 0,3%, e a mistura foi incubada em banho-maria a 37°C durante 3 h. A reação enzimática foi parada com a adição de 8 mL de ácido tricloroacético a 5%. Após, alíquotas foram centrifugadas a 9.167 g por 10 min, e 1 mL do sobrenadante foi misturado com 1 mL de NaOH 0,5 M. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 440 nm em espectrofotômetro. A contagem do número de UFC/mL foi realizada em cada tempo de incubação. A atividade proteolítica foi expressa como a razão entre as absorbâncias e o log de UFC/mL. Controles negativos foram realizados sem os cultivos fúngicos. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

6.5.4 Co-incubação de ritonavir sobre biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

6.5.4.1 Influência na adesão inicial dos biofilmes

A influência da co-incubação de RIT na adesão inicial de *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) foi testada em 6 h de adesão celular. Os biofilmes foram formados com inóculos iniciais de 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 em pH 7,0. O RIT foi co-incubado com as células em RPMI nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL. Alíquotas de 200 µL foram adicionados aos poços das microplacas. Após o tempo de adesão de 6 h, os sobrenadantes dos biofilmes foram descartados, os poços foram lavados com PBS-Tween 20, e a inibição da adesão foi determinada pela coloração por cristal violeta, conforme descrito no item 6.4.1

(pag. 42), e pelo ensaio de redução do XTT, conforme descrito no item 6.4.2.1 (pag. 43). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

6.5.4.2 *Influência na maturação dos biofilmes*

A influência da co-incubação do RIT na formação de biofilmes por *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) foi realizada após 24 h e 48 h de cultivo. Os biofilmes foram formados com inóculos iniciais de 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 em pH 7,0. Os inóculos foram co-incubados com RIT na concentração de 10 µg/mL e 100 µg/mL. Alíquotas de 200 µL foram adicionadas aos poços das microplacas, e as placas foram incubadas por 6 h. Após o tempo de adesão, os sobrenadantes foram removidos e os poços foram lavados com PBS-Tween 20. Após, os poços foram preenchidos com RPMI nos controles, e RPMI contendo o RIT nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL. As placas foram reincubadas a 35°C e, após 24 h de cultivo, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20, para a leitura de biomassa e atividade metabólica dos biofilmes. As placas correspondentes às leituras de 48 h de cultivo foram lavadas com PBS-Tween 20, e repreenchidas com RPMI contendo o RIT nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, e novamente foram incubadas até completarem as 48 h de incubação. A leitura de biomassa e atividade metabólica dos biofilmes foi realizada pela coloração com cristal violeta, e a atividade metabólica dos biofilmes, pelo ensaio de redução do XTT, conforme descrito nos itens 6.4.1 e 6.4.2.1, respectivamente (CORDEIRO et al., 2016). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

6.5.4.3 *Morfologia e estrutura dos biofilmes*

A influência da co-incubação do RIT na morfologia e estrutura dos biofilmes produzidos por *T. asahii* e *T. inkin* foi avaliada por Microscopia Confocal e Microscopia Eletrônica de Varredura. Os biofilmes foram formados em lâminas de Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, New York City, NY), conforme descrito no item 6.4.2 (pag. 43), com RIT nas concentrações de 10 µg/mL and 100 µg/mL. A adesão das células foi realizada por 6 h de incubação e os meios de cultivo com e sem RIT foram trocados a cada 24 h. Após 48 h de incubação, os biofilmes foram lavados com PBS-Tween 20 e processados de acordo com cada técnica.

Microscopia confocal: A microscopia confocal foi realizada de acordo com Di Bonaventura et al. (2006). Sobre os biofilmes, foram adicionadas alíquotas do corante de

fluorescência *Live/Dead*TM (Invitrogen). As lamínas foram então avaliadas em Microscopia Confocal Nikon C2, a 488 nm para detecção do corante SYTO9, que identifica células viáveis em verde, e a 561 nm para detecção do iodeto de propídio, que identifica células não-viáveis. Para as análises das imagens, cinco pontos equidistantes foram selecionados nas imagens tridimensionais e a quantificação colorimétrica de intensidade, bem como a mensuração do *Z-slice* foram realizadas usando software *ImageJ* 1.50i (COLLINS, 2007).

Microscopia eletrônica de varredura: Os biofilmes foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,15 M com azul de alcian (0,1%) e processados conforme descrito no item 6.4.4 (pag. 46). As lamínas foram cobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Inspect S50, em vácuo de 15 kV. As imagens foram processadas com o software *ImageJ* 1.50i (CORDEIRO et al., 2016).

6.5.4.4 Sensibilidade de biofilmes maduros

O perfil de sensibilidade dos biofilmes de *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) ao RIT foi realizado conforme Cordeiro et al. (2016), com modificações. Os biofilmes foram formados como descrito no item 6.4.2 (pag. 43), e incubados durante 48 h. Após a incubação, os sobrenadantes foram removidos, os biofilmes foram lavados com PBS-Tween 20 e então foram preenchidos com alíquotas de 200 µL de RPMI contendo o RIT nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL. As placas foram reincubadas a 35°C e, após 24 h de cultivo, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 e novamente preenchidas com RPMI contendo o RIT nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL. Após atingirem 48 h de cultivo, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 e as leituras realizadas pelo ensaio de redução do XTT, conforme descrito no item 6.4.2.1 (pag. 43). A atividade antifúngica do RIT sobre os biofilmes foi expressa em porcentagem de inibição em comparação ao controle sem o RIT. Anfotericina B na concentração de 10xCIM foi usada como controle. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

6.5.4.5 Atividade proteolítica em biofilmes

A influência da co-incubação do RIT na atividade proteolítica em biofilmes de *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) foi realizada em 6 h, 24 h e 48 h de cultivo. Os biofilmes foram formados com inóculos iniciais de 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 em pH 7,0, co-

incubados com RIT na concentração de 10 µg/mL e 100 µg/mL. Alíquotas de 200 µL foram adicionadas aos poços das microplacas, e as placas foram incubadas por 6 h a 35°C e 80 rpm.

Após o tempo de adesão de 6 h, as placas correspondentes a análise em 6 h foram separadas, e as demais foram lavadas e preenchidas novamente com RPMI contendo o RIT nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL e reincubadas nas mesmas condições. Após 24 h e 48 h de cultivo, as últimas placas foram analisadas. Para cada um dos tempos de análise, os biofilmes foram raspados dos poços com auxílio de ponteiros estéreis e coletados com seus respectivos sobrenadantes de cultivo. O biofilmes raspados acrescidos dos sobrenadantes foram vigorosamente agitados em vórtex e centrifugados a 9.167 g por 10 min.

A análise de atividade proteolítica foi realizada de acordo com Charney e Tomarelli (1947), com modificações de Cordeiro et al. (2016), conforme previamente descrito no item 6.4.5 (pag. 47). A contagem do número de UFC/mL presente nos biofilmes com sobrenadantes foi realizada em cada tempo de incubação. A atividade proteolítica foi expressa como a razão entre as absorbâncias e o log de UFC/mL. Controles negativos foram realizados sem os cultivos fúngicos. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

6.5.4.6 Composição de matriz dos biofilmes

A análise da composição de proteínas de matriz dos biofilmes co-incubados com RIT foi avaliada em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*. Os biofilmes foram formados como descrito no item 6.4.2 (pag. 43), em fragmentos de catéter do tipo Abocath, de 5 cm de comprimento, em RPMI e em RPMI com RIT na concentração de 100 µg/mL. Nas primeiras 6 h de incubação, e a cada 24 h de incubação, os meios foram trocados e os catéteres foram submersos em meio RPMI e meio RPMI com RIT a 100 µg/mL. Após 48 horas de incubação, os catéteres foram lavados cuidadosamente e imersos em água ultrapura estéril. Os catéteres foram então vigorosamente agitados em vórtex por 2 min cada, e sonicados para a remoção dos biofilmes. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados em membranas de 0,22 µm. Os sobrenadantes filtrados contendo a matriz dos biofilmes foram congelados a -20°C e liofilizados.

Para a caracterização estrutural e comparação de sequências encontradas, as soluções de matriz dos biofilmes foram dissolvidas em água deionizada e misturadas com a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) na proporção de 1/3 µL. As amostras foram depositadas nas placas marcadas, e então analisadas por meio de MALDI-TOF MS, (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) (COSTA et al. 2012). Para

obtenção dos espectros de massa, um espectrômetro de massa MALDI-TOF MS Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) equipado com um Nd:YAG de 355 nm, foi operado no modo de refletor positivo com a frequência do laser de 100 Hz.

Os intervalos de detecção foram de m/z 400 a 5000, e os íons parentais selecionados foram fragmentados usando o modo LIFT. Os dados foram adquiridos utilizando o *Flex Control Software* (Versão 3.3, Bruker Daltonics) e os espectros foram processados usando o *Flex Analysis Software* (Versão 3.3, Bruker Daltonics) de acordo com Biemann (1992). As sequências de aminoácidos obtidas que não foram observadas nos controle foram comparadas com as sequências nas bases de dados de proteínas e peptídeos, como o NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), BioPep (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/blast/>).

6.5.5 Pré-exposição de *T. asahii* e *T. inkin* ao ritonavir

A influência da pré-exposição diária de células de *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) ao RIT durante 14 dias foi avaliada quanto à sensibilidade aos antifúngicos, influência na adesão celular, formação de biofilme e hidrofobicidade celular. Inóculos iniciais de 1×10^6 células/mL foram continuamente expostos ao RPMI e RPMI contendo RIT nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, com trocas diárias de meio de cultivo e incubação a 35°C e 80 rpm. Este procedimento foi repetido durante 14 dias. Posteriormente às exposições, as células pré-expostas foram centrifugadas a 4.583 g durante 10 min, os sobrenadantes foram descartados e as células foram lavadas com PBS estéril e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Estas células foram utilizadas como inóculos iniciais nos experimentos a seguir.

6.5.5.1 Sensibilidade aos antifúngicos

A influência da pré-exposição ao RIT sob a sensibilidade de *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) aos antifúngicos AMB, ITZ, FLZ e VRZ em crescimento planctônico foi avaliada de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008), conforme previamente descrito no item 6.4.3 (pag. 45). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

6.5.5.2 Influência na adesão e formação dos biofilmes

A influência da pré-exposição de células de *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) ao RIT sobre a capacidade de adesão celular e formação de biofilmes foi testada sem a co-incubação com RIT, somente em RPMI, conforme descrito no item 6.4.2 (pag. 43). As células pré-expostas foram ajustadas para 1×10^6 células/mL em RPMI e adicionadas nas placas de fundo chato. Após 6 h de incubação a 35°C a 80 rpm, os sobrenadantes foram coletados, e as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 e lidas pela coloração com cristal violeta e ensaio de redução do XTT, conforme previamente descrito nos itens 6.4.1 e 6.4.2.1, respectivamente. Para a leitura de 24 h e 48 h, outras placas foram preenchidas com RPMI e reincubadas nas mesmas condições descritas. As análises de biomassa e atividade metabólica em 24 h e 48 h de cultivo dos biofilmes foram realizadas conforme previamente descrito (CORDEIRO et al., 2016). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

6.5.5.3 Influência na hidrofobicidade celular

A influência da pré-exposição ao RIT na hidrofobicidade celular de *T. asahii* (n=2) e *T. inkin* (n=2) foi avaliada conforme Anil et al. (2001), com modificações. As células pré-expostas foram suspensas em PBS estéril, e a absorvância foi medida a 540 nm. Para cada condição testada, 1,5 mL da suspensão de células foi adicionada a dois tubos de vidro estéreis, representando um “controle” e um “teste”. Aliquotas de 300 µL de xilol (Dinâmica, Brasil) foram adicionados aos tubos “teste” e ambos os tubos “controle” e “teste” foram incubados em banho-maria a 37°C durante 10 min. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos cada, e retornados ao banho-maria por mais 30 min, para permitir a separação completa das fases imiscíveis.

Após a incubação, a fase aquosa inferior das amostras foi cuidadosamente recolhida e transferida para novos tubos de vidro, e vigorosamente agitada em vórtex. Resíduos de xilol foram evaporados usando fluxos de ar levemente direcionados aos tubos durante 2 min. A absorvância das fases aquosas dos tubos “teste” e dos tubos “controle” foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. RPMI estéril sem células foi utilizado como controle negativo. O índice de hidrofobicidade superficial celular (IHSC) foi expresso de acordo com Borghi et al. (2011), de acordo com a fórmula da figura 3 abaixo, onde “A” significa a absorvância do tubo controle, e “B” a absorvância da fase aquosa após a exposição ao xilol. Os experimentos foram realizados em duplicata.

$$IHSC = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

Figura 3: Equação para determinação do Índice de Hidrofobicidade Superficial Celular em células pré-expostas ao RIT.

6.6 Análise Estatística

Todos os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e os testes de comparação múltipla entre as médias foram analisados pelo pós-teste Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad Prism*[®] 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

7 RESULTADOS

1ª PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Caracterização dos biofilmes

7.1.1 Formação de biofilmes

A figura 4 mostra a formação de biomassa dos biofilmes de *T. inkin* (n=7), nos meios de cultura e condições avaliadas. O inóculo que possibilitou maior formação de biofilmes foi 1×10^6 células/mL para os três meios testados ($p < 0,05$) (Figura 4 A, B e C). O caldo CLED foi o meio que possibilitou menor formação de biofilme por *T. inkin*, quando comparado aos demais meios de cultura ($p < 0,05$) (Figura 4 D). Em relação aos biofilmes formados em Sabouraud e RPMI, não foram observadas diferenças significativas entre estes dois meios de cultivo.

Em meio CLED, a maior formação de biofilmes ocorreu em pH 5,5 ($p < 0,05$). Em RPMI e Sabouraud, maiores valores de absorvâncias foram visualizados em biofilmes formados em pH 7,0 ($p < 0,05$) (Figura 4 E). Os resultados mostraram que a agitação permitiu maior formação de biofilmes, independente da temperatura, quando comparada à produção de biofilmes sem agitação ($p < 0,05$). A agitação parece sobrepujar a temperatura, de modo que biofilmes produzidos a 28°C em agitação apresentaram maior biomassa que biofilmes produzidos a 35°C sem agitação (Figura 4 F).

A maior produção de biofilmes ocorreu em meios Sabouraud e RPMI, com inóculo inicial de 1×10^6 células/mL em pH 7,0 e incubação a 35°C em agitação de 80 rpm ($p < 0,05$). Biofilmes formados em meio RPMI com inóculo inicial de 1×10^6 células/mL em pH 7,0 e incubação a 35°C em agitação de 80 rpm, foram os parâmetros escolhidos para os experimentos de biofilme ao longo deste estudo.

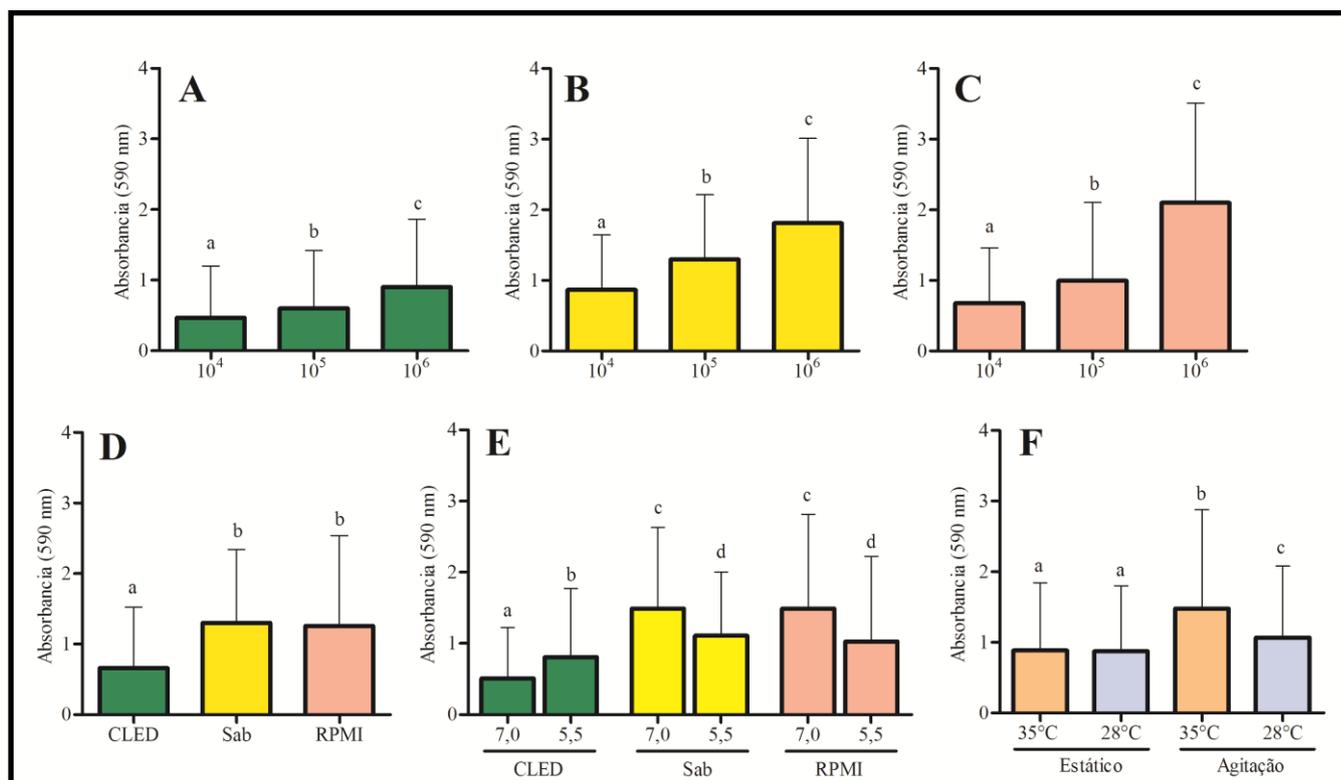


Figura 4: Formação de biofilmes de *T. inkin* (n=7) em diferentes condições de incubação. Meios de cultivo (A) Caldo CLED; (B) Caldo Sabouraud; (C) RPMI; Inóculo inicial de 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 células/mL. (D) Todos os meios de cultura. (E) Meios de cultura por pH testado. (F) Condições de incubação. Absorbâncias representa, a biomassa dos biofilmes. Agitação de 80 rpm. Letras diferentes representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.1.2 Cinética de crescimento dos biofilmes

Em experimento prévio, foram testados diferentes tempos de adesão, e os resultados mostraram que o tempo de adesão que possibilitou maior formação de biofilmes foi 6 h de incubação (Dados não mostrados). Os resultados obtidos na cinética de crescimento dos biofilmes mostraram que, em 6 h de incubação, tempo de adesão das células ao substrato, foram observadas baixas atividade metabólica e biomassa nos biofilmes, conforme observado na figura 5 (A e B). Ao longo do tempo de incubação, tanto a biomassa como a atividade metabólica dos biofilmes aumentaram, atingindo a maturidade em 48 h ($p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças entre a biomassa e a atividade metabólica dos biofilmes entre 48 h e 72 h de incubação.

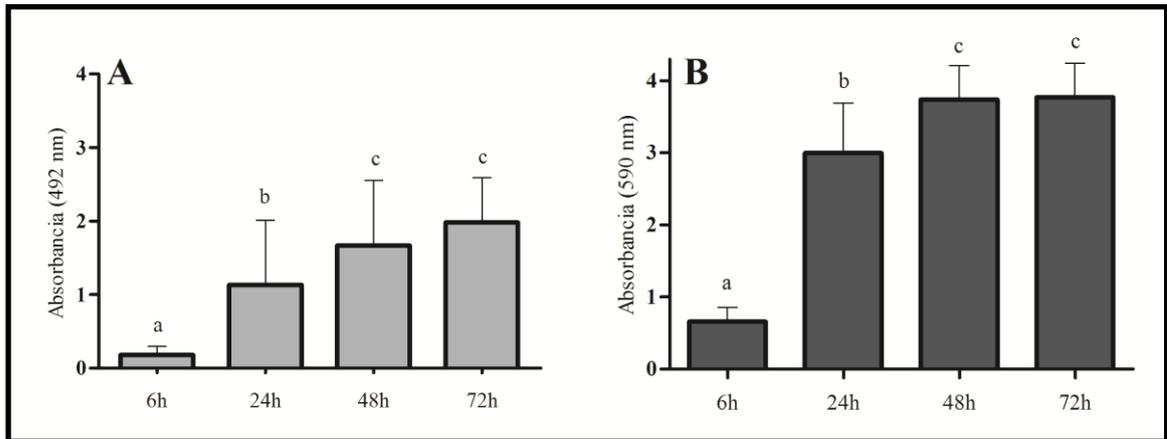


Figura 5: Cinética de crescimento dos biofilmes de *T. inkin* (n=7). (A) Atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT. (B) Biomassa por coloração com cristal violeta. Letras diferentes representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

As imagens de MEV ao longo dos tempos de crescimento dos biofilmes corroboram com os resultados encontrados para biomassa. Nas primeiras seis horas de incubação, a adesão celular ao substrato e a formação de microcolônias fica evidenciada. Em 24 h, observa-se o início da formação de uma estrutura mais especializada de células aderidas. Nos demais tempos de incubação, as imagens mostram o aumento da biomassa e a estruturação morfológica dos biofilmes, com a observação de canais de circulação de água e massas celulares densas (Figura 6).

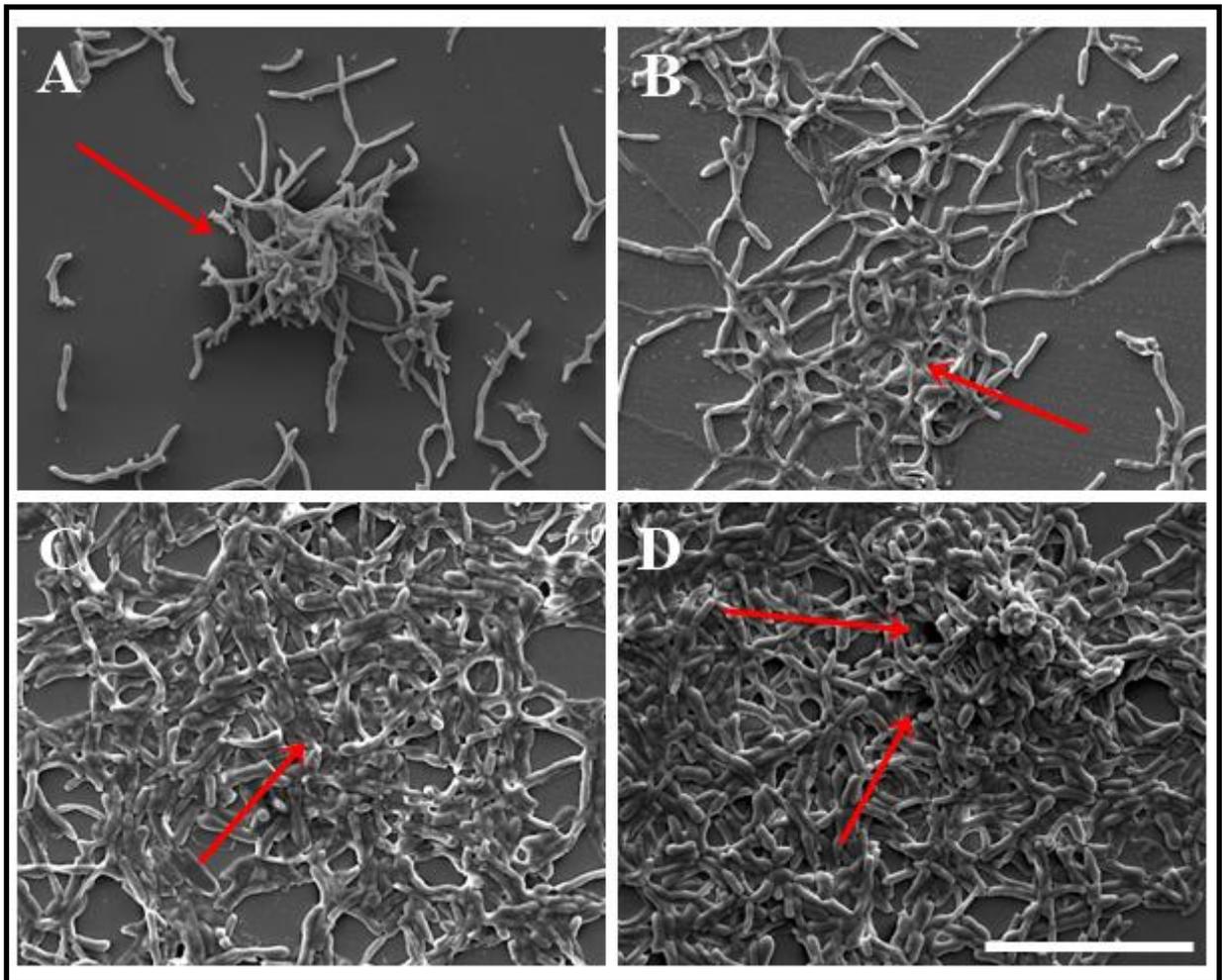


Figura 6: Microscopia Eletrônica de Varredura dos diferentes tempos de crescimento do biofilme de *T. inkin* CEMM 05-6-075. (A) 6 h de incubação, setas indicam as microcolônias; (B) 24 h de incubação; (C) 48 h de incubação (D) 72 h de incubação; Setas indicam as malhas de formação dos biofilmes em B e C. Setas indicam canais de circulação em D. Magnitude: 2000x. Barra: 50 μ m.

7.1.2.1 Dispersão de células viáveis e quantificação de ácidos nucléicos totais liberados

Os resultados mostraram que o número de células liberadas no sobrenadante foi constante ao longo dos tempos de crescimento dos biofilmes, conforme observado na Figura 7 (A). O número de células viáveis associadas aos biofilmes aumentou com o passar do tempo de incubação. Estes resultados mostram que os biofilmes são fonte de liberação de células viáveis desde os primeiros estágios de desenvolvimento.

A liberação de ácidos nucleicos no sobrenadante de cultivo foi analisada tanto em sobrenadantes de biofilmes quanto em sobrenadantes de crescimento planctônico de *T. inkin*, como observado na figura 7 B. Não foram observadas diferenças na liberação de ácidos nucleicos em 24 h e 48 h de cultivo. Entretanto, foi evidenciada uma maior liberação de ácidos nucleicos em 72 h de incubação, para ambas as condições ($p < 0,05$).

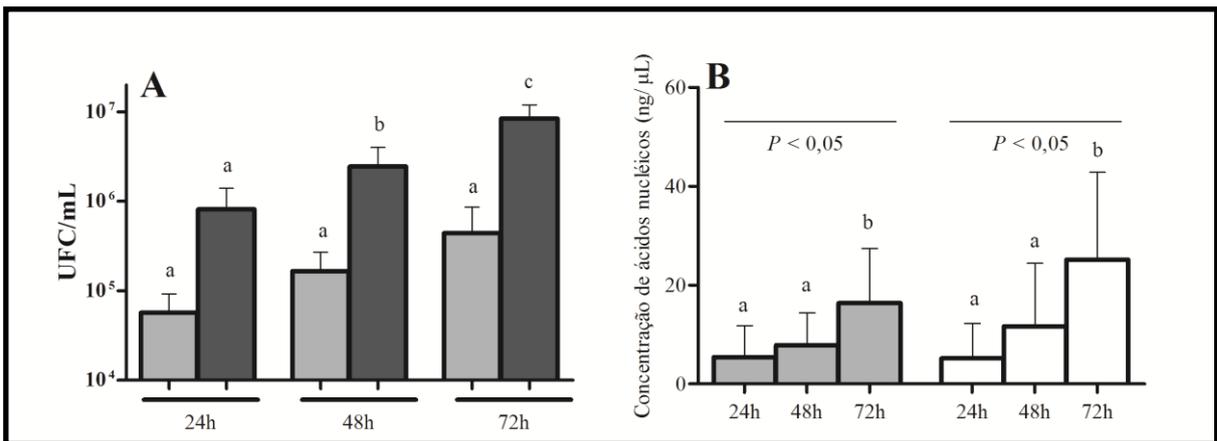


Figura 7: Liberação de células viáveis e ácidos nucleicos em sobrenadante de biofilmes de *T. inkin* (n=7). (A) Unidades formadoras de colônia por mililitro presentes nos sobrenadantes de cultivo dos biofilmes (barras cinza claro) e associadas aos biofilmes (barras cinza escuro). (B) Liberação de ácidos nucleicos em sobrenadante de biofilmes (barras cinza) e sobrenadante de crescimento planctônico (barras brancas). Letras diferentes representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.1.3 Sensibilidade planctônica e dos biofilmes aos antifúngicos

A tabela 2 mostra os valores e intervalos de concentrações inibitórias mínimas (CIM) para os antifúngicos AMB, CAS, FLZ, ITZ e VRZ sobre os isolados de *T. inkin* em crescimento planctônico e em biofilmes maduros. Em crescimento planctônico, os valores de CIM para AMB variaram de 1 a >16 $\mu\text{g/mL}$. A CIMB em biofilmes variou de 16 a >128 $\mu\text{g/mL}$ para AMB. Todos os isolados apresentaram CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$ para CAS, e os biofilmes apresentaram CIMB de 16 a >128 $\mu\text{g/mL}$ para CAS. Para os azólicos testados, *T. inkin*, em crescimento planctônico, mostraram valores de CIM entre 0,06 e 2 $\mu\text{g/mL}$, de acordo com o CLSI (2008). Em contrapartida, os biofilmes apresentaram tolerância às

concentrações de azólicos testadas. Para FLZ, os valores de CIMB variaram de 64 µg/mL a >128 µg/mL, e de 128 µg/mL a >128 µg/mL para ITZ. Para VRZ, CIMB foram >128 µg/mL.

Tabela 2: Valores de Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) de *T. inkin* (n=7) frente a anfotericina B (AMB), caspofungina (CAS), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ) e voriconazol (VRZ), em µg/mL.

Isolado <i>T. inkin</i>	AMB		CAS		FLZ		ITZ		VRZ	
	CIM	CIMB*	CIM	CIMB**	CIM	CIMB**	CIM	CIMB**	CIM	CIMB**
CEMM 05-6-074	2	16	8	16	1	64	0,06	> 128	0,06	> 128
CEMM 05-6-086	2	32	8	32	0,5	> 128	0,06	> 128	0,06	> 128
CEMM 01-1-144	> 16	> 128	8	32	2	> 128	0,125	> 128	0,125	> 128
CEMM 05-6-075	2	16	8	64	2	> 128	0,06	> 128	0,125	> 128
CEMM 05-6-057	8	> 128	8	> 128	0,5	> 128	0,125	> 128	0,125	> 128
CEMM 01-1-143	2	32	8	64	2	> 128	0,06	128	0,06	> 128
CEMM 01-1-145	1	32	8	128	1	> 128	0,06	> 128	0,06	> 128

* 100% de inibição dos biofilmes

** 50% de inibição dos biofilmes

7.1.4 Morfologia ultraestrutural dos biofilmes de *T. inkin*

A figura 6 (D) e a figura 8 (A-F) mostram as morfologias dos biofilmes produzidos pelos sete isolados de *T. inkin*, após 72 h de incubação. Os biofilmes produzidos por *T. inkin* correspondem à aglomerados celulares densos, com células em diferentes morfotipos - blastoconídeos, artroconídeos, hifas e pseudo-hifas longas e curtas – associados em multicamadas. Os biofilmes formados em catéteres não apresentaram diferenças morfológicas (Figura 8 G e H) quando comparados aos demais biofilmes formados em laminas de vidro cobertas com poli-L-Lisina. A matriz associada aos biofilmes foi melhor preservada e visualizada em biofilmes fixados com o azul de alcian, como observado na figura 8 (G e I), quando comparado aos biofilmes formados nos mesmos dispositivos e fixados sem o tratamento (Figura 8 - H e J).

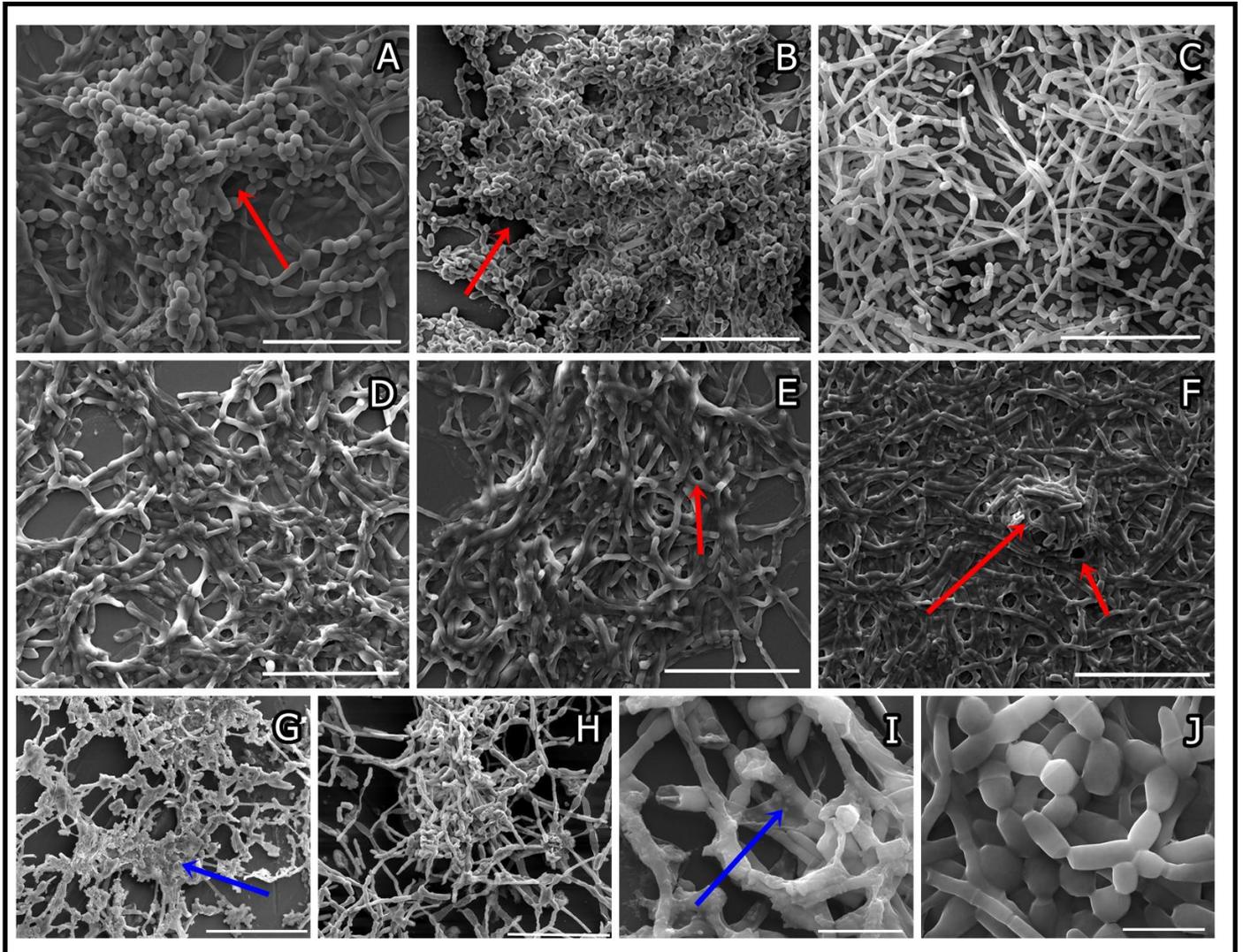


Figura 8: Análise ultraestrutural de biofilmes de *T. inkin*, após 72 h de incubação. (A) CEMM 05-6-057; (B) CEMM 05-6-086; (C) CEMM 01-1-144; (D) CEMM 01-1-143; (E) CEMM 01-1-145; (F) CEMM 05-6-074. Setas vermelhas indicam canais de passagem de água. Biofilme do isolado CEMM 05-6-057 em catéter fixado com azul de alcian (G) e sem azul de alcian (H). Biofilme do isolado CEMM 05-6-057 em laminas de vidro recobertas com Poli-L-Lisina e fixado com azul de alcian (I) e sem azul de alcian (J). Setas azuis indicam material extracelular. (A-H) Aumento de 2000 x. (I-J) Aumento de 8000 x. Barra A-H: 50 μ m. Barra I-J: 10 μ m.

7.1.5 Atividade proteolítica total em biofilmes

A atividade proteolítica foi detectada tanto em crescimento planctônico como em biofilmes produzidos por *T. inkin*, conforme observado na figura 9. A atividade proteolítica foi observada após 6 h de incubação, durante o período de adesão celular dos biofilmes. Com o passar do tempo, a atividade proteolítica aumentou significativamente somente em células associadas em biofilmes, com máxima produção entre 48 h e 72 h de cultivo, em comparação com o crescimento planctônico ($p < 0,05$).

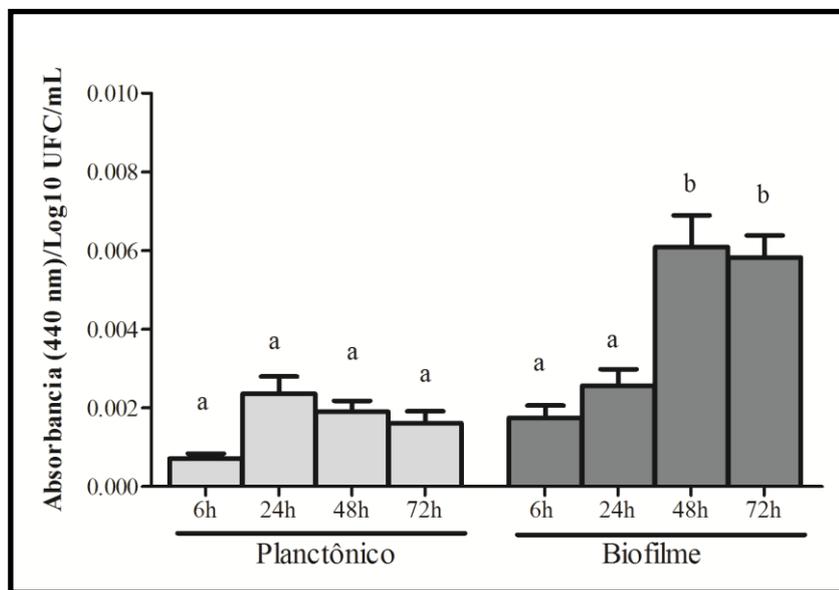


Figura 9: Detecção da atividade proteolítica por *T. inkin* (n=7) em cultivos planctônicos e em biofilmes. Letras diferentes representam diferença estatística significativa entre as condições ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

2ª PARTE EXPERIMENTAL

7.2 Atividade inibitória do inibidor de protease ritonavir

7.2.1 Sensibilidade de *T. asahii* e *T. inkin* e interação com antifúngicos

O RIT reduziu o crescimento de *T. asahii* e *T. inkin*, como mostrado na figura 10. O RIT inibiu aproximadamente 50% do crescimento das cepas a 100 µg/mL, e inibiu 100% do crescimento em três das quatro cepas testadas a 200 µg/mL. Com relação à sensibilidade de *T. asahii* (n=2) frente aos antifúngicos, os isolados apresentaram CIM de 0,25 e 4 µg/mL para AMB, 2 e 8 µg/mL para FLZ, 0,25 e 0,5 µg/mL para ITZ e 0,062 e 0,125 µg/mL para VRZ. Não foi observado sinergismo do RIT com nenhum dos antifúngicos testados (resultados não mostrados).

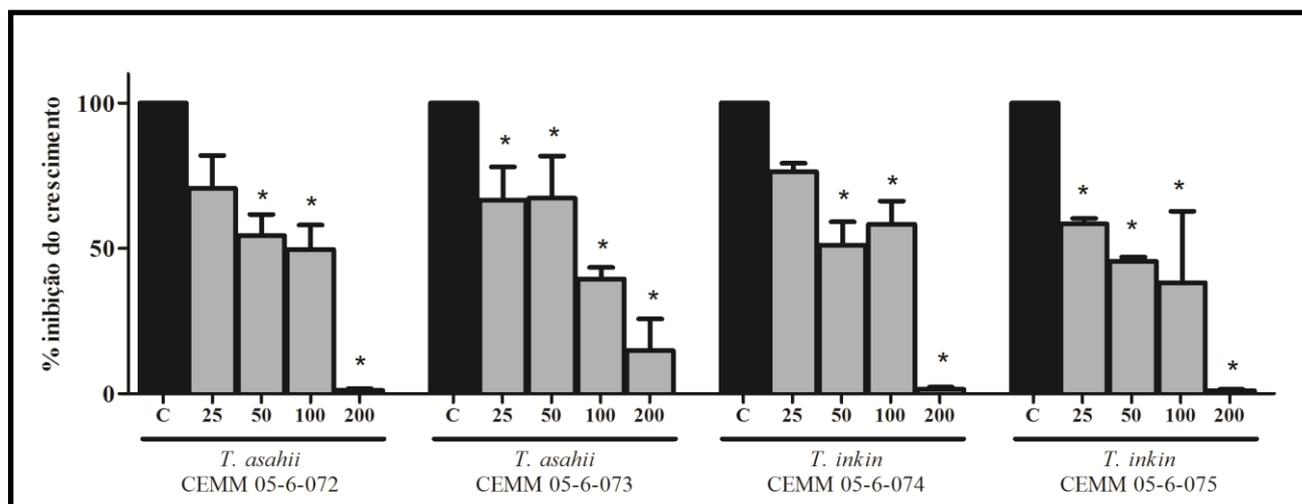


Figura 10: Inibição do crescimento de *T. asahii* e *T. inkin* na presença do RIT (barras cinzas) em concentrações de 25 a 200 µg/mL. Controles sem o RIT (barras pretas). Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle de cada cepa ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.2.2 Atividade proteolítica em crescimento planctônico

O RIT reduziu a atividade proteolítica em 48 h e 72 h de incubação em crescimento planctônico de *T. inkin* e *T. asahii*, como observado na figura 11 ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças na atividade proteolítica nos primeiros tempos de cultivo.

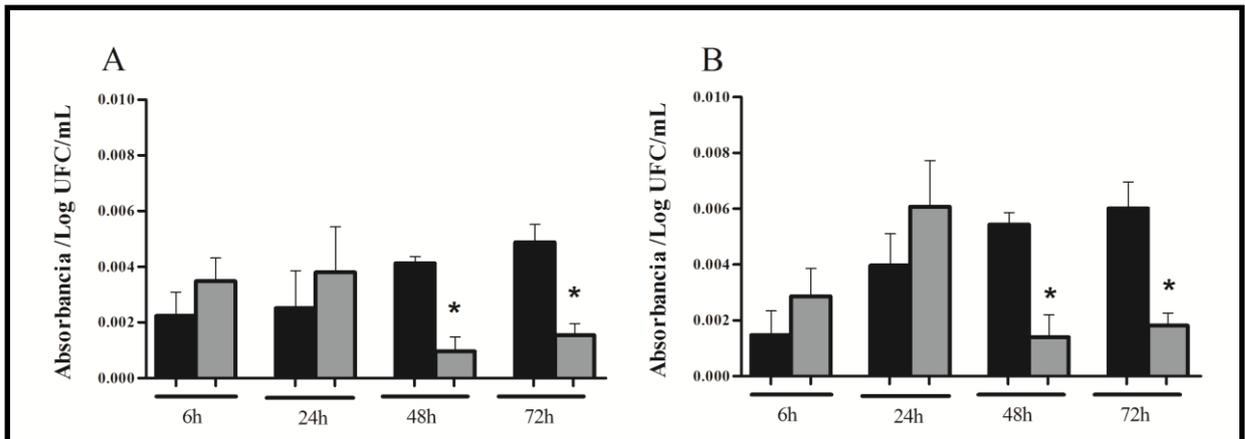


Figura 11: Atividade proteolítica em crescimento planctônico de *T. asahii* (A) e *T. inkin* (B) na presença de RIT a 100 µg/mL (barras cinzas) e controle sem RIT (barras pretas). Os asteriscos representam diferença estatística em comparação ao controle de cada tempo ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.2.3 Efeito da Co-incubação de ritonavir sobre biofilmes de *Trichosporon* sp.

7.2.3.1 Influência na adesão inicial dos biofilmes

Após 6 h de incubação, o RIT na concentração de 100 µg/mL diminuiu a adesão celular de *Trichosporon*. A redução na adesão foi de aproximadamente 77% e 90% da atividade metabólica (Figura 12A) e de 47% e 60% da biomassa (Figura 12B), em média, para ambos os biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, em comparação com o controle ($p < 0,05$).

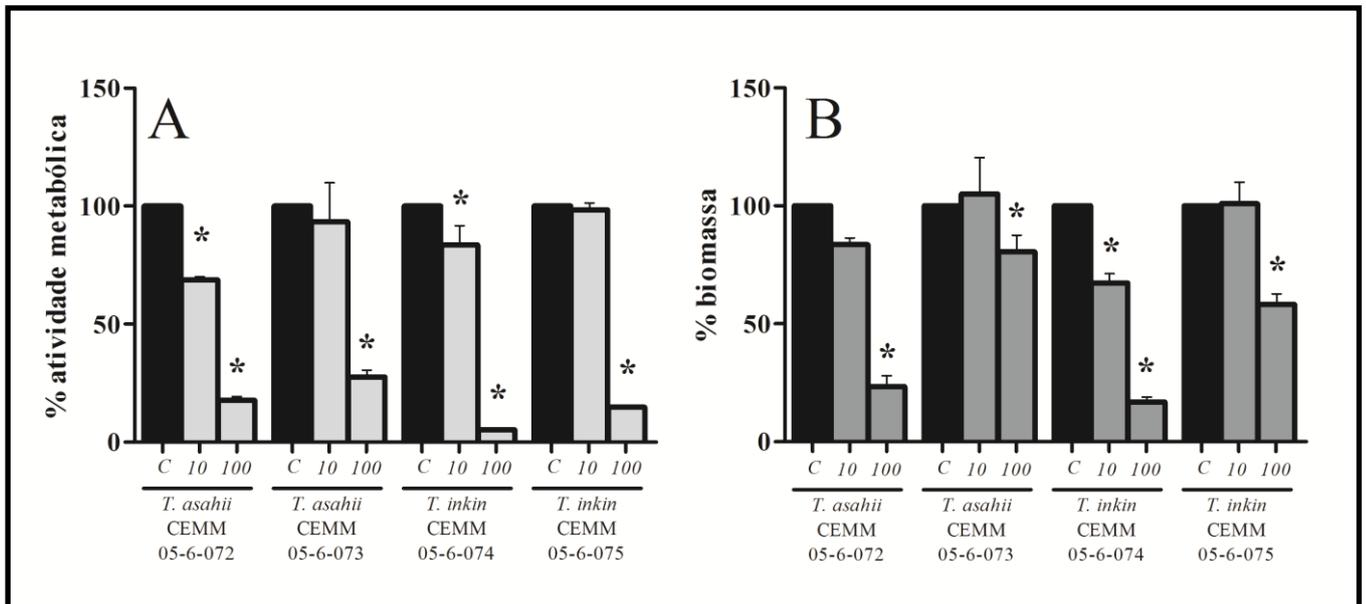


Figura 12: Porcentagem de adesão celular após 6 h de incubação. Atividade metabólica (A) e biomassa (B) na presença de 10 µg/mL e 100 µg/mL de RIT (barras cinzas) e controle sem RIT (barras pretas). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle de cada cepa ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.2.3.2 Influência na maturação dos biofilmes

Após 24 h e 48 h de desenvolvimento dos biofilmes, a co-incubação do RIT a 100 µg/mL diminuiu em torno de 95% da atividade metabólica dos biofilmes em todas as cepas testadas ($p < 0,05$) (Figura 13 A e C). O RIT também diminuiu significativamente a biomassa dos biofilmes de todas as cepas testadas nesta concentração, como observado na figura 13 ($p < 0,05$) (B e D). Já na concentração de 10 µg/mL, em 24 h, o RIT diminuiu a atividade metabólica somente de *T. inkin* CEMM 05-6-074 e a biomassa de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 (Figura 13 A e B) ($p < 0,05$). Em 48 h, o RIT a 10 µg/mL reduziu a atividade metabólica e biomassa somente de *T. inkin* CEMM 05-6-074 (Figura 13 C e D) ($p < 0,05$).

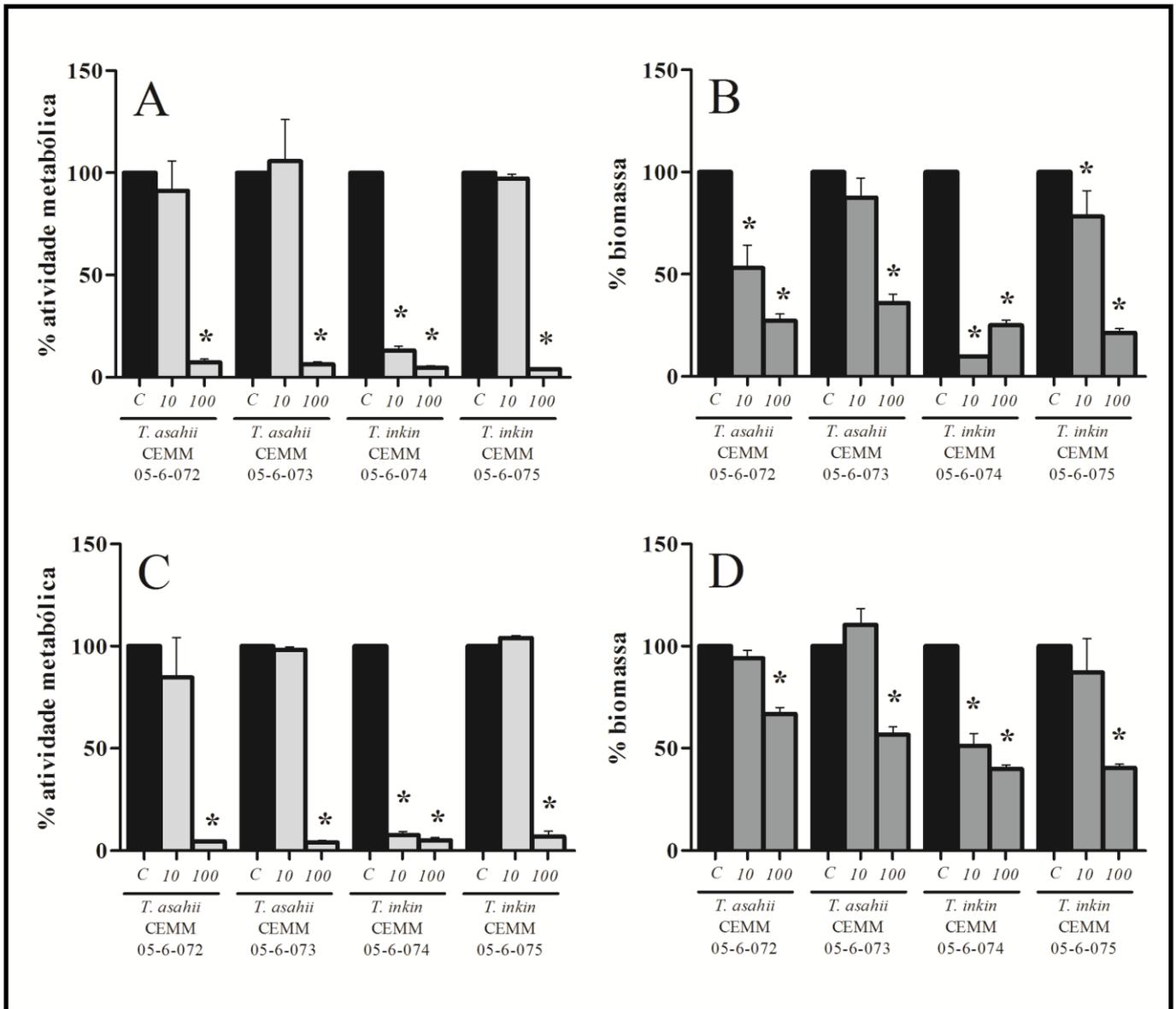


Figura 13: Porcentagem de formação de biofilmes em 24 h de incubação (A-B) e 48 h de incubação (C-D) na presença de 10 µg/mL e 100 µg/mL de RIT (barras cinzas) e controle sem RIT (barras pretas). Atividade metabólica (A e C) e biomassa (B e D). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle de cada cepa ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.2.3.3 Morfologia e estrutura dos biofilmes

As imagens de microscopia confocal mostraram (figura 14) que biofilmes produzidos por *T. asahii* CEMM 05-6-073 e *T. inkin* CEMM 05-6-075 são compostos de densas massas de células viáveis, representadas pela cor verde, compostas de blastoconídeos, artroconídeos,

hifas e pseudo-hifas. O *Z-slice* (espessura) do biofilme de *T. asahii* é de 70,4 μm , e o *Z-slice* de *T. inkin* é de 52,8 μm (Tabela 3). A co-incubação do RIT a 10 $\mu\text{g/mL}$ resultou na formação de biofilmes de *Z-slice* de 23,75 μm para *T. asahii* (redução de 66,3% comparado com o controle sem RIT), e de 44,2 μm para biofilmes de *T. inkin* (redução de 16,3%), conforme descrito na tabela 3.

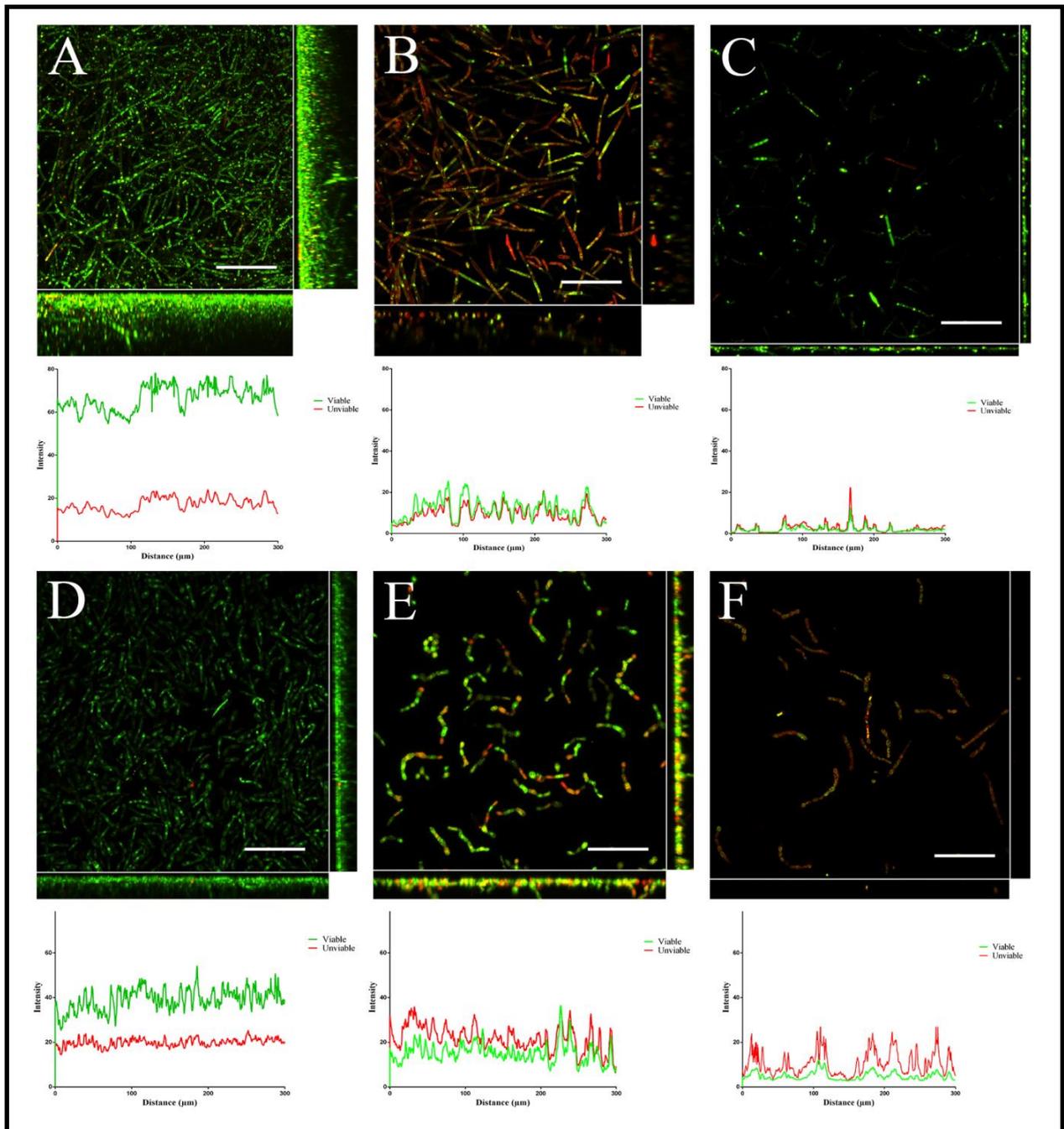


Figura 14: Imagens de microscopia confocal dos biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-073 (A a C) and *T. inkin* CEMM 05-6-075 (D a F) após 48 h de incubação, com seus respectivos gráficos de intensidade colorimétrica. Biofilmes desenvolvidos sem o RIT (A e D), com RIT a 10 $\mu\text{g/mL}$ (B e E) e RIT a 100 $\mu\text{g/mL}$ (C e F). Linhas verdes correspondem a células viáveis. Linhas vermelhas correspondem a células inviáveis. Magnitude: 40x. Barra: 100 μm .

A co-incubação com RIT a 100 µg/mL apresentou uma redução mais pronunciada na espessura dos biofilmes, com a observação de poucas células aderidas em biofilmes monocamada. O *Z-slice* para *T. asahii* foi de 12 µm (redução de 83%) e de 24,8 µm em biofilmes de *T. inkin* (redução de 53%).

O efeito do RIT também foi analisado por medição de intensidade colorimétrica das fotos obtidas, como mostrado na tabela 3. Os resultados mostraram que o RIT a 10 µg/mL resultou em uma diminuição da atividade metabólica para o biofilme de *T. asahii* e de *T. inkin*, com redução de intensidade colorimétrica verde de 81% e 61%, respectivamente. RIT a 100 µg/mL reduziu em 97% e 87% a intensidade colorimétrica verde nos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente.

Tabela 3: Análise da intensidade colorimétrica e *Z-slice* dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* co-incubados com ritonavir.

Parametros	<i>T. asahii</i>					<i>T. inkin</i>				
	Controle	Ritonavir				Controle	Ritonavir			
		10*	Variação**	100	Variação		10	Variação	100	Variação
Verde (Pxl)*	66	12	- 81,8%	2	- 97%	39	15	- 61,5%	5	- 87,2%
Vermelho (Pxl)*	18	9	- 50,0%	3	- 83,3%	20	22	+ 10%	11	- 45%
Total (Pxl)*	84	21	- 75,0%	5	- 94%	59	37	- 37,3%	16	- 72,9%
<i>Z-slice</i> (µm)*	70,4	23,75	- 66,3%	12	- 83%	52,8	44,2	- 16,3%	24,8	- 53%

* µg/mL de RIT

** Variação negativa representa diminuição. Variação positiva representa aumento.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-073 e *T. inkin* CEMM 05-6-075, compostos de blastoconídeos, artroconídeos, pseudo-hifas e hifas longas e curtas, organizadas em estruturas densas, compostas por multicamadas de células intimamente associadas, como observado na Figura 15. Na presença de RIT a 10 µg/mL, é possível observar um número reduzido de células associadas aos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*. Já a co-incubação com RIT a 100 µg/mL resultou em biofilmes compostos de raras células fúngicas aderidas ao substrato.

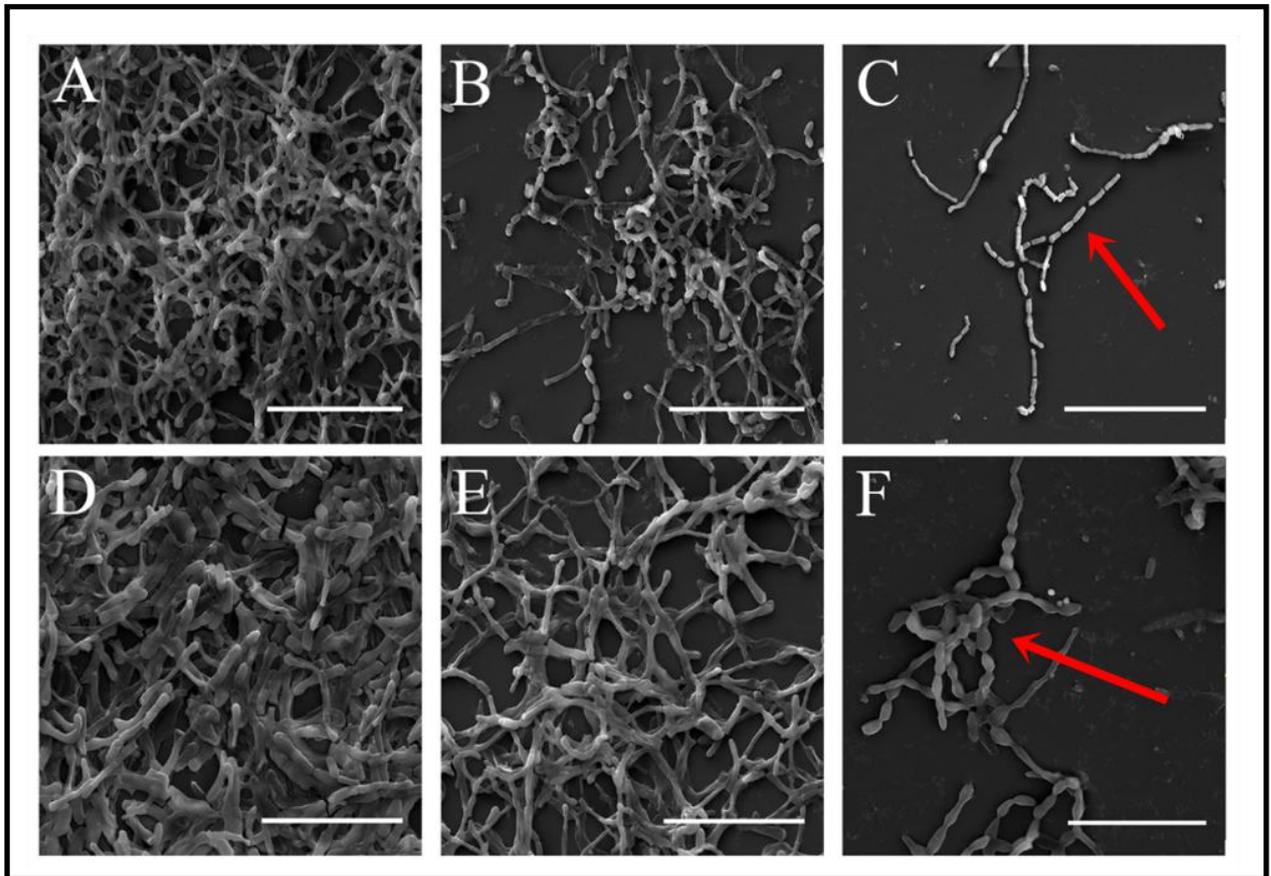


Figura 15. Morfologia e ultraestrutura de biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-073 (A-C) e *T. inkin* CEMM 05-6-075 (D-F) após 48 h de incubação com co-incubação de RIT. Controles sem RIT (A e D), com RIT a 10 µg/mL (B e E) e com RIT a 100 µg/mL (C e F). As setas vermelhas indicam a destruição da estrutura dos biofilmes na presença do RIT a 100 µg/mL. Ampliação: 2000x. Barra: 50µm.

7.2.3.4 Sensibilidade de biofilmes maduros

O tratamento de biofilmes maduros com o RIT não interferiu na atividade metabólica dos biofilmes produzidos por *T. asahii* e *T. inkin*, como observado na figura 16. Biofilmes expostos a AMB na concentração de 10 x CIM reduziram significativamente a atividade metabólica dos biofilmes maduros nas quatro cepas testadas ($p < 0,05$).

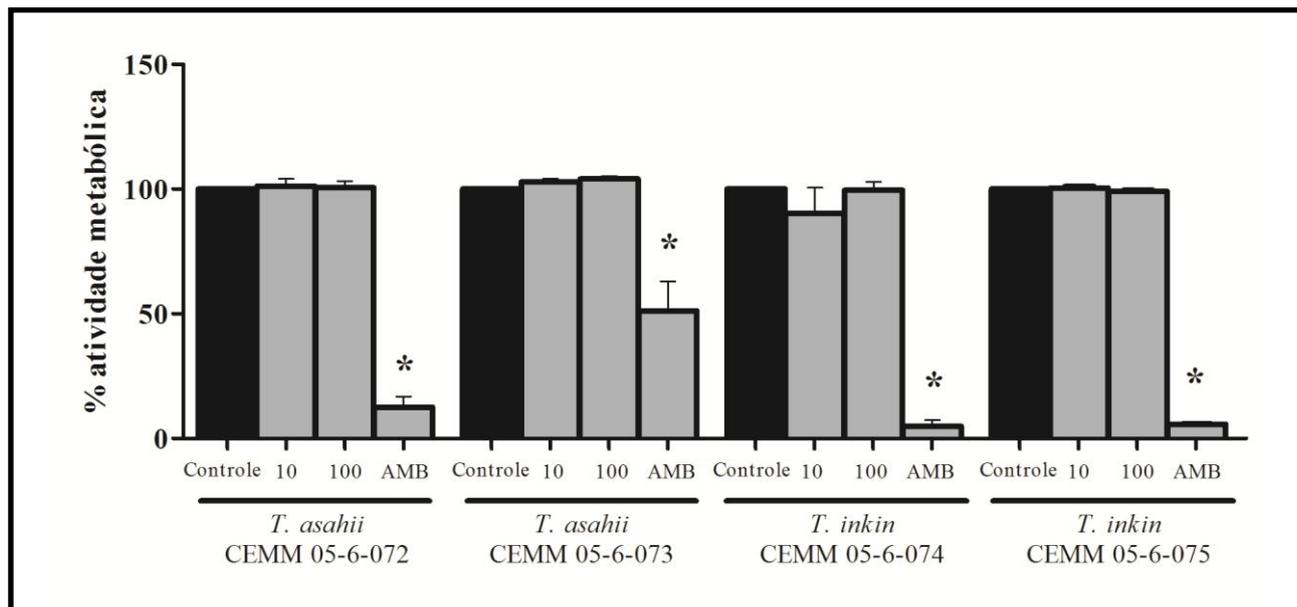


Figura 16: Sensibilidade dos biofilmes maduros ao RIT. AMB testada na concentração de 10x CIM. RIT a 10 e 100 µg/mL (barras cinzas) e controles sem as drogas (barras pretas). Asteriscos representam diferença estatística significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.2.3.5 Atividade proteolítica em biofilmes

Os resultados mostram que o RIT, na concentração de 100 µg/mL, reduziu a atividade proteolítica em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, em 48 h de incubação, conforme observado na figura 17 ($p < 0,05$). RIT a 10 µg/mL reduziu a atividade proteolítica apenas em biofilmes maduros de *T. asahii* ($p < 0,05$). Quando a atividade proteolítica foi avaliada em comparação com outros tempos de incubação, foi observado que, para *T. asahii*, a atividade proteolítica em 48 h foi significativamente menor que em 6 h de incubação ($p < 0,05$). Esse fenômeno não foi observado durante o desenvolvimento dos biofilmes de *T. inkin*.

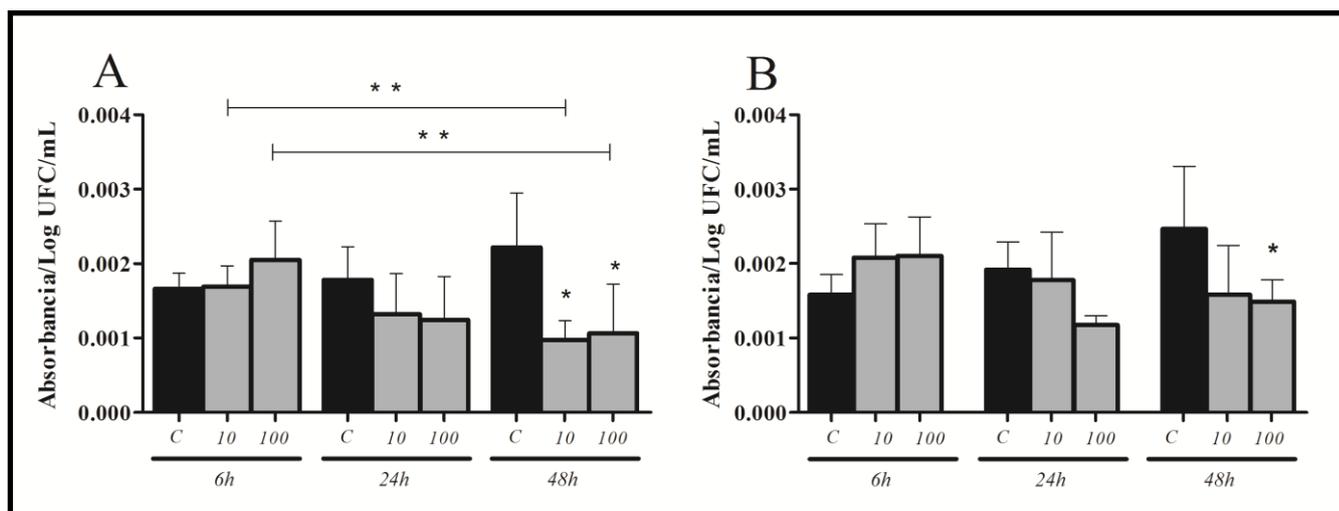


Figura 17: Atividade proteolítica durante a formação dos biofilmes (6 h, 24 h and 48 h) de (A) *T. asahii* (n=2) e (B) *T. inkin* (n=2), na presença de 10 e 100 µg/mL de RIT (barras cinzas) e controles sem RIT (barras pretas). Asteriscos representam diferença estatística em comparação ao controle em cada tempo ($p < 0,05$). Asteriscos duplos representam diferença significativa entre os tratamentos correspondentes ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.2.3.6 Composição de matriz dos biofilmes

A análise do espectros de massa da matriz dos biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-073 e *T. inkin* CEMM 05-6-075 (Figura 18) mostrou um grupo de picos de m/z entre 400,845 a 598,135 Da. Entretanto, na presença do RIT a 100 µg/mL, dois picos diferentes foram observados em ambas as espécies, em 743 Da e 759 Da, que não foram observados nos controles sem o RIT.

A sequência obtida do pico de 743 Da mostrou a sequência de aminoácidos: ácido aspártico-valina-alanina-prolina-alanina-prolina, que corresponde, pelo NCBI BLAST, com 100% de similaridade à proteína isopenicilina N-sintase. O segundo pico de 759 Da apresentou uma pequena sequência de aminoácidos (ácido aspártico-alanina-arginina-fenilalanina), que representam uma sequência alinhada com um grande número de proteínas expressas por fungos do gênero *Trichosporonales*.

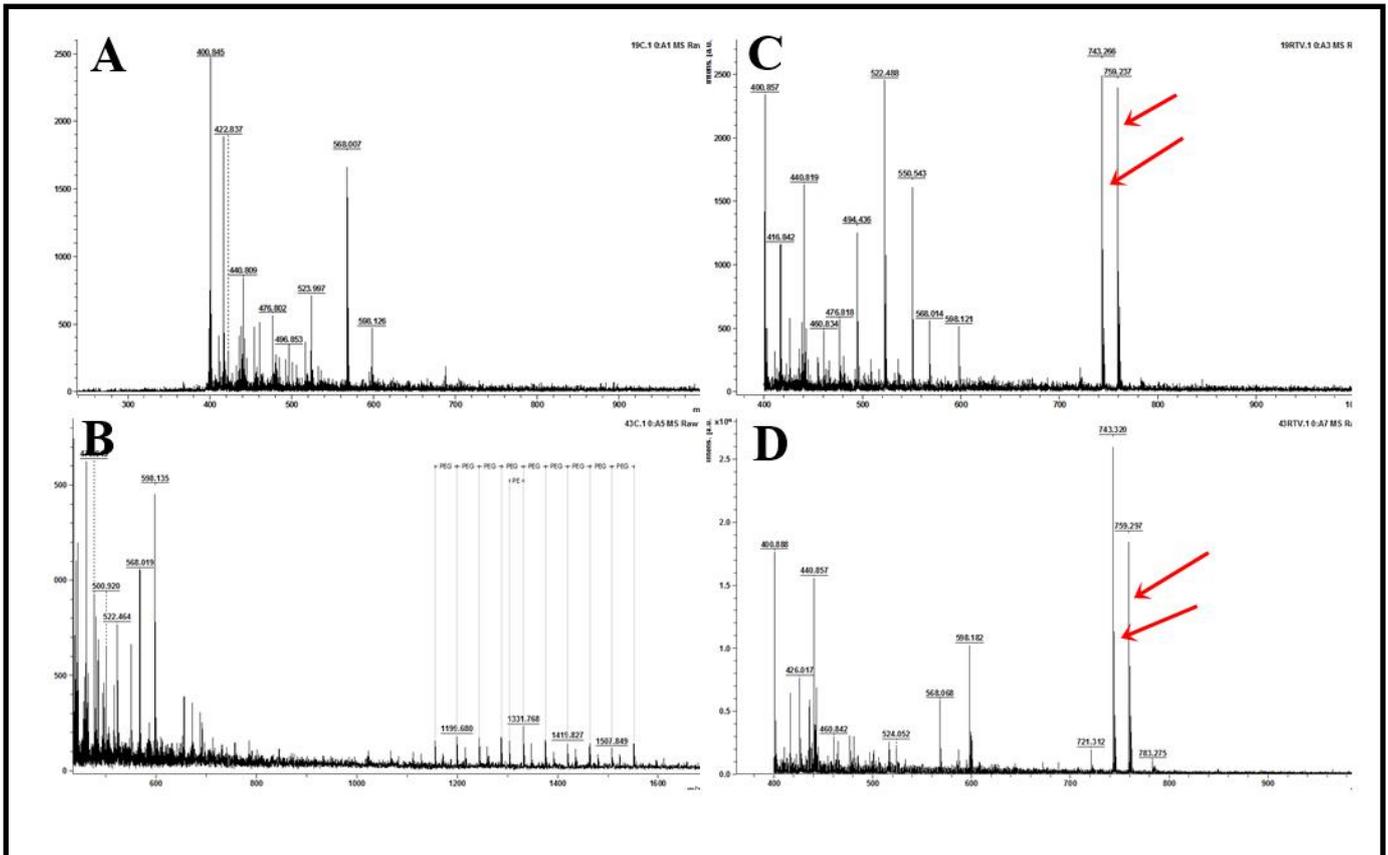


Figura 18: Espectros de picos protéicos de matriz dos biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-073 (A e B) e *T. inkin* CEMM 05-6-075 (C e D). Controles (A e C) e tratamento com 100 µg/mL (B e D). Setas mostram os picos presentes somente na presença de RIT.

7.2.4 Pré-exposição de células de *Trichosporon sp.* ao ritonavir

7.2.4.1 Sensibilidade aos antifúngicos

A influência da pré-exposição diária de células de *T. asahii* e *T. inkin* ao RIT foi avaliada sobre a sensibilidade aos antifúngicos. Os resultados estão expressos na tabela 4. Para *T. asahii* CEMM 05-6-072, o valor de CIM para AMB reduziu 16x após pré-exposição ao RIT a 100 µg/mL, e reduziu 8x após pré-exposição ao RIT a 10 µg/mL. Já *T. asahii* CEMM 05-6-073, *T. inkin* CEMM 05-6-074 e *T. inkin* 05-6-075, após pré-exposição ao RIT a 100 µg/mL, reduziram os valores de CIM para AMB em 8x, 4x e 8x, respectivamente, em comparação ao controle sem pré-exposição. Para FLU, somente em *T. inkin* CEMM 05-6-074, foi observado aumento de 4x a CIM em células pré-expostas ao RIT a 100 µg/mL. Para

os demais antifúngicos azólicos, a pré-exposição não interferiu nos valores de CIM em nenhuma das cepas testadas.

Tabela 4: Valores das concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g/mL}$) dos antifúngicos frente a células de *T. asahii* e *T. inkin* após a pré-exposição ao RIT a 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 14 dias

Isolados	Concentração de pré-exposição*	AMB*	FLZ*	ITZ*	VRZ*
<i>T. asahii</i> (CEMM 05-6-072)	100	0,062	4	0,25	0,125
	10	0,125	4	0,5	0,062
	Controle	1	4	0,25	0,125
<i>T. asahii</i> (CEMM 05-6-073)	100	0,25	2	0,125	0,062
	10	2	1	0,125	0,062
	Controle	4	2	0,25	0,031
<i>T. inkin</i> (CEMM 05-6-074)	100	0,125	1	0,062	0,062
	10	0,5	0,25	0,062	0,031
	Controle	0,5	0,25	0,125	0,031
<i>T. inkin</i> (CEMM 05-6-075)	100	0,125	1	0,125	0,031
	10	1	1	0,125	0,031
	Controle	1	1	0,125	0,031

* $\mu\text{g/mL}$

7.2.4.2 Influência na adesão inicial dos biofilmes

A pré-exposição das células de *T. asahii* e *T. inkin* ao RIT na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 14 dias diminuiu a adesão celular, com redução de 83% e 50% da atividade metabólica dos biofilmes de *T. asahii* e de *T. inkin*, respectivamente, conforme observado na Figura 19A ($p < 0,05$). A biomassa celular aderida também foi reduzida em aproximadamente 67% para *T. asahii*, e de aproximadamente 47% para células de *T. inkin* ($p < 0,05$) (Figura 19 B). A pré-exposição das células a 10 $\mu\text{g/mL}$ de RIT reduziu a biomassa de todos os isolados, mas reduziu em 75%, aproximadamente, somente a atividade metabólica dos biofilmes de *T. asahii* ($p < 0,05$).

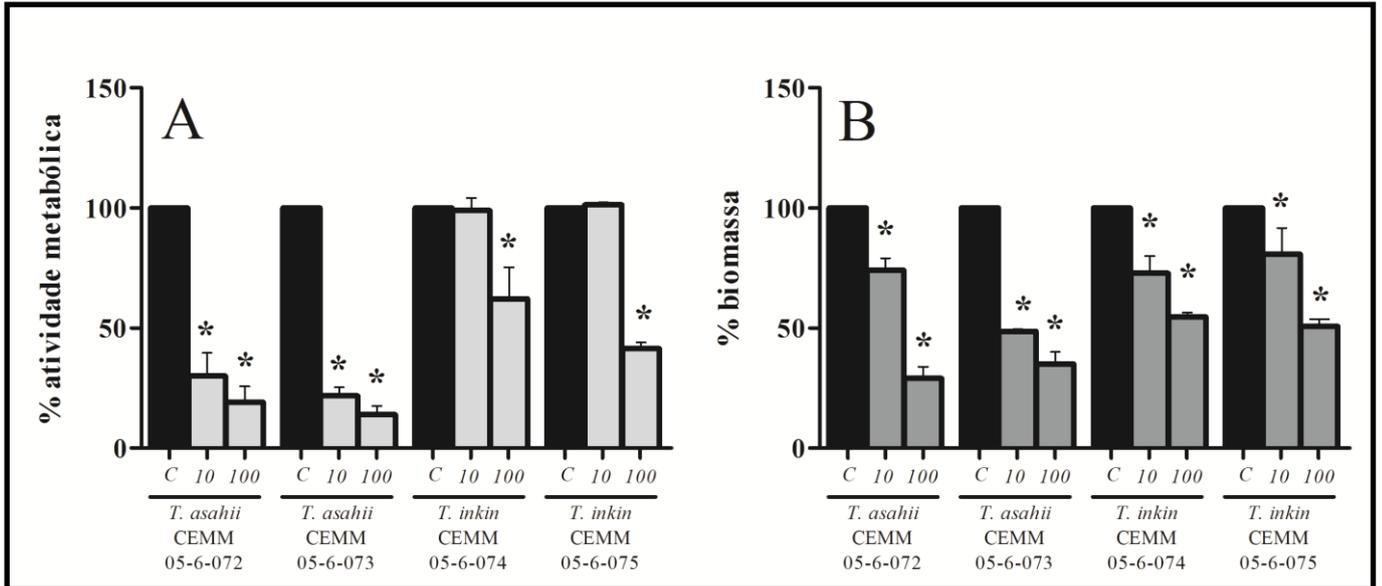


Figura 19: Adesão celular após 6 h de incubação por células pré-expostas ao RIT nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL (barras cinzas), e sem RIT (barras pretas). Atividade metabólica (A) e biomassa (B). Asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação aos controles ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.2.4.3 Influência na formação dos biofilmes

Biofilmes formados por células pré-expostas ao RIT a 100 µg/mL apresentaram desenvolvimento comprometido, com redução da atividade metabólica em 24 h de cultivo em todos os isolados testados (Figura 20 A e B) ($p < 0,05$). No entanto, a biomassa foi reduzida somente em *T. asahii* CEMM 05-6-073 e *T. inkin* CEMM 05-6-075 ($p < 0,05$). A pré-exposição das células não afetou a maturação dos biofilmes após 48 h de cultivo, como observado na figura 20 (C e D).

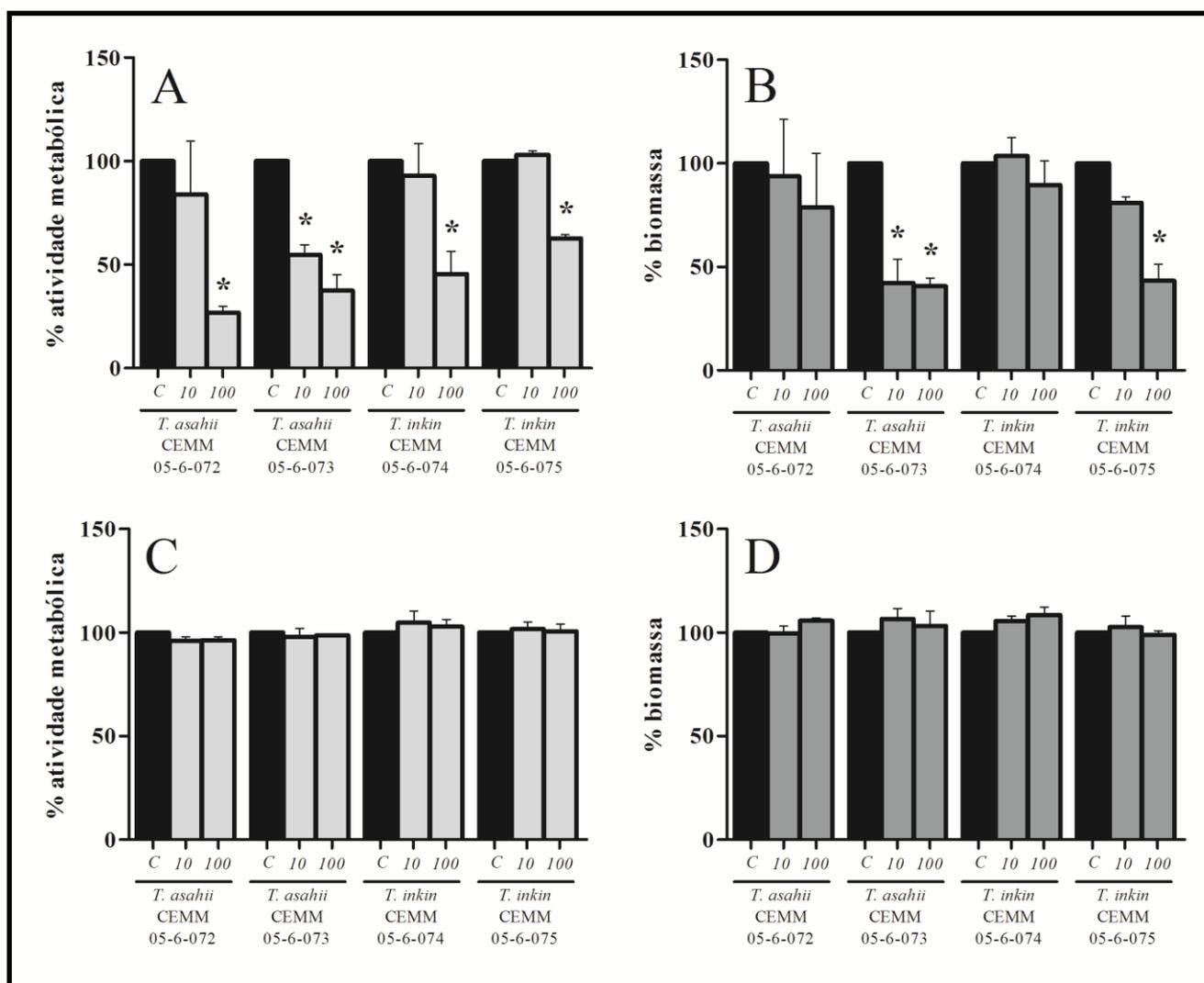


Figura 20: Formação de biofilmes em 24h (A e B) e 48h (C e D) de incubação, por células pré-expostas ao RIT nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL (barras cinzas), e sem RIT (barras pretas). Atividade metabólica (A e C) e biomassa (B e D). Asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação aos controles ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

7.2.4.4 Influência na hidrofobicidade celular

A pré-exposição das células de *T. asahii* e *T. inkin* ao RIT a 100 µg/mL durante 14 dias reduziu a hidrofobicidade superficial celular ($p < 0,05$). A pré-exposição ao RIT a 10 µg/mL também diminuiu a hidrofobicidade superficial celular ($p < 0,05$), exceto para *T. asahii* CEMM 05-6-073, como observado na figura 21.

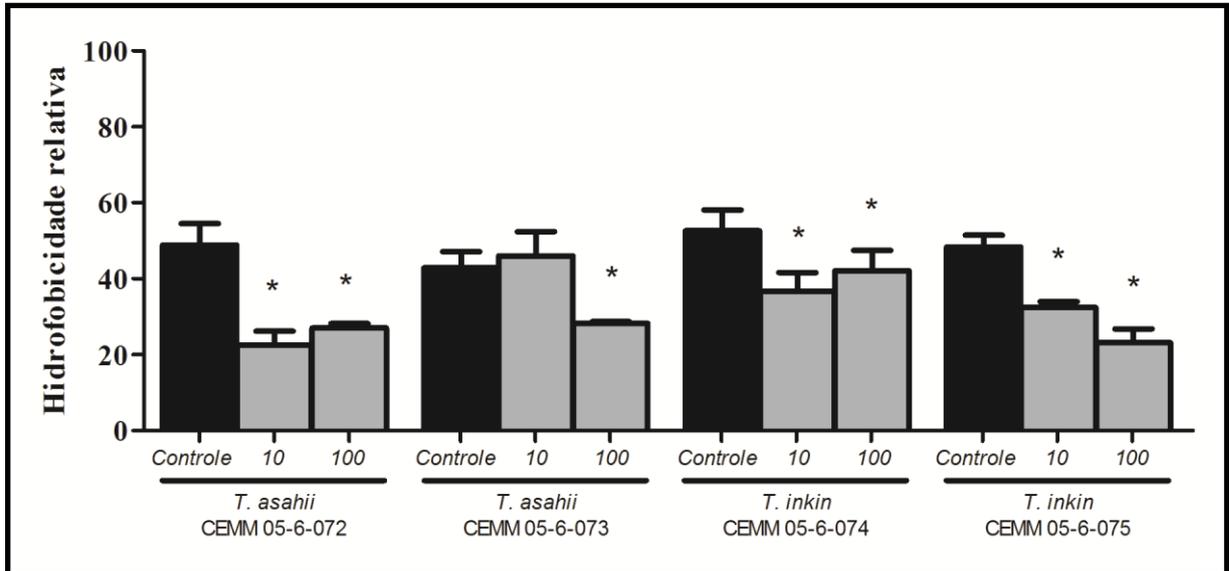


Figura 21: Hidrofobicidade celular superficial relativa de *T. asahii* e *T. inkin* após 14 dias de pré-exposição ao RIT a 10 µg/mL e 100 µg/mL (barras cinzas), e sem RIT (barras pretas). Asteriscos representam diferença significativa em relação aos controles ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

8 DISCUSSÃO

Biofilmes são estruturas compostas por células aderidas a uma superfície e envolvidas por uma matriz extracelular. A capacidade de formar biofilmes é importante na relação parasito-hospedeiro e no desenvolvimento de processos infecciosos, uma vez que as células associadas em biofilmes exibem características fenotípicas distintas, como o aumento da produção de enzimas e resistência antifúngica (DOUGLAS, 2002; DI BONAVENTURA et al., 2006; HASAN et al., 2009; KUMAMOTO, 2002; GOKCE et al., 2007). Embora a importância dos biofilmes na patogênese da infecção fúngica seja parcialmente compreendida, pouco se sabe sobre a morfofisiologia dos biofilmes produzidos por *Trichosporon*.

A interação de células planctônicas a determinados substratos é pré-requisito para a adesão celular, que precede a formação de biofilmes microbianos (BLANKENSHIP e MITCHELL, 2006). Neste trabalho, inicialmente, foi avaliado o tempo que possibilitou maior adesão celular de *T. inkin*, e os resultados indicaram que a maior formação de biofilme ocorreu após 6 horas de contato celular ao substrato, quando comparados a tempos menores de contato (dados não mostrados). Em *C. albicans*, a formação de tubo germinativo ocorre dentro de 3 a 6 horas após a fixação fúngica (HAWSER e DOUGLAS, 1994), além do envolvimento de diversos reguladores transcricionais associados a expressão de adesinas (FINKEL et al., 2012; FOX e NOBILE, 2013). Embora existam poucos relatos sobre os eventos associados à adesão celular de *Trichosporon*, já se sabe que o tempo de aderência depende das espécies fúngicas e condições de cultura. Segundo DiBonaventura et al. (2006) a filamentação foi observada em *T. asahii* após 1h de adesão, e após 4h foram observadas microcolônias, que evoluíram para biofilmes iniciais com a interligação dessas microcolônias por uma rede de filamentos.

No presente estudo, a máxima formação de biofilme foi observada com uma concentração inicial de células de 1×10^6 células/ml. Esta concentração de inóculo tem sido utilizada por alguns autores para ensaios de biofilmes fúngicos (DIBONAVENTURA et al., 2006; PUSATERI et al., 2009). Entretanto, Junqueira et al. (2012) e Iturrieta-Gonzalez et al. (2014) analisaram biofilmes de *Trichosporon* a partir de um inóculo inicial de 10^7 células/ml. Esta concentração de células não foi utilizada neste estudo, pois os biofilmes atingiram densidade ótica máxima quando formados por inóculo inicial de 1×10^6 células/mL. Embora tenham sido realizados estudos para compreender a influência da concentração de células no inóculo inicial de desenvolvimento dos biofilmes fúngicos (DIBONAVENTURA et al., 2006, SENEVIRATNE et al., 2008), o efeito da concentração inicial de inóculo no biofilme

bacteriano já é conhecida (STEPANOVIC et al., 2003). Cotter et al. (2009) mostrou que o oxigênio dissolvido é rapidamente consumido em biofilmes bacterianos de altas concentrações de inóculo, resultando em condições anaeróbicas, o que por sua vez, podem influenciar na arquitetura e na resistência aos antibióticos. Além disso, a comunicação por *quorum sensing* nos biofilmes é mediada pela densidade celular, e coordena diversos eventos fisiológicos celulares (KIEVIT e IGLEWSKI, 2000; MILLER e BASSLER, 2001). Sob baixa concentração celular, proteínas de adesão são expressas em *Staphylococcus aureus*, entretanto, sob alta concentração celular, a expressão de proteínas de superfície celular diminui (KIEVIT e IGLEWSKI, 2000). É razoável supor que os biofilmes fúngicos também sejam afetados pela densidade de inóculo.

As condições ótimas para formação de biofilmes de *T. inkin* também foram avaliadas em mais quatro parâmetros: substrato nutritivo (CLED, Sabouraud, RPMI), pH (5,5 e 7,0), temperatura (28°C e 35°C) e agitação (estática e 80 rpm). Os biofilmes de *T. inkin* foram estimulados por temperaturas mais elevadas e incubação sob agitação, independentemente do substrato. Estudos anteriores têm mostrado que estas condições também aumentam o crescimento do biofilmes de outras espécies de fungos, tais como *T. asahii* e *Cryptococcus* (DIBONAVENTURA et al., 2006; AJESH e SREEJITH, 2012).

Biofilmes de *T. inkin* foram formados em meios com baixa concentração de glicose (CLED e RPMI) e meio rico em nutrientes (Sabouraud), tanto em pH 5,5 e 7,0. Determinados sinais ambientais estão associados à formação de biofilmes, tais como a disponibilidade de nutrientes. Foi relatado que a formação de biofilmes de *Candida* é afetada pela disponibilidade de nutrientes no ambiente (NING et al., 2013; SANTANA et al., 2013). Os resultados aqui obtidos confirmam a versatilidade fisiológica de *Trichosporon*, gênero considerado sem exigências nutricionais, capaz de crescer e formar biofilmes em diversos substratos (MAGALHÃES et al., 2008; LAKSHMI e DAS, 2013; DOSTALKOVA et al., 2015; ANITHA et al., 2015).

Após a fase de adesão, os biofilmes de *T. inkin* se desenvolveram durante 48 h, quando a estrutura atingiu a maturidade. Di Bonaventura et al. (2006) mostraram que biofilmes de *T. asahii* aumentaram exponencialmente até 72 h, mas muitos autores demonstraram que os biofilmes fúngicos atingem sua maior biomassa após 48 horas de incubação (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006; LATIFF et al., 2010). É provável que essas diferenças estejam relacionadas com o tamanho do inóculo e condições experimentais testadas.

A fim de caracterizar os eventos fisiológicos relacionados a liberação de células nos biofilmes, no presente estudo foi investigada a dispersão de células viáveis ao longo das

etapas de formação e de maturação. Os resultados mostraram que a dispersão de células ocorre desde a fase inicial de formação e continua durante a fase de maturação. De acordo com o exame microscópico das células presentes no sobrenadante, a maioria das células eram blastoconídeos e artroconídeos. Estruturas filamentosas raramente foram observadas independentemente da fase de desenvolvimento (dados não mostrados). Em estudo realizado por Uppuluri et al. (2010) com biofilmes de *C. albicans*, em sistema de fluxo contínuo de nutrição, foi demonstrado que a dispersão de células é um fenômeno que ocorre de forma ininterrupta durante todo o ciclo de desenvolvimento de biofilme. Os autores também descobriram que as células dispersas foram predominantemente na forma de levedura e apresentaram maior virulência e maior capacidade de formar biofilmes, o que reforça a importância de estudos acerca da fisiologia de células provenientes de biofilmes.

Juntamente com a liberação de células viáveis, a dispersão de ácidos nucléicos nos sobrenadantes de cultivo foi observada neste estudo, de forma ininterrupta durante o ciclo de desenvolvimento dos biofilmes, atingindo sua liberação máxima em 72 h de cultivo. Cabe ressaltar que a análise microscópica do sobrenadante dos biofilmes não revelou debris celulares, de modo que apenas células íntegras foram observadas. Essa observação nos leva a supor que pelo menos parte dos ácidos nucléicos detectados estavam associados à matriz dos biofilmes e foram liberados para o sobrenadante.

Estudos anteriores descreveram o papel de ácidos nucléicos em biofilmes microbianos. Quantidades elevadas de DNA extracelular são ativamente incorporadas na matriz dos biofilmes e assumem um papel importante na manutenção da integridade estrutural do biofilme microbiano (WHITCHURCH et al., 2002; MARTINS et al., 2010), assim como na resistência antimicrobiana (MULCAHY et al., 2008; MARTINS et al., 2011). Embora a quantidade de DNA associado à matriz de biofilmes fúngicos seja consideravelmente mais elevada que o DNA liberado no sobrenadante (MARTINS et al., 2010), é consenso que o DNA possa desempenhar papel estrutural e na resistência aos antifúngicos (RAJENDRAN et al., 2013; TAFF et al., 2013; KRAPMAN et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2014). Embora pouco se saiba sobre o papel dos ácidos nucléicos nos biofilmes de *Trichosporon*, é possível sugerir que o DNA desempenhe papel semelhante ao DNA em biofilmes de outros fungos.

A resistência a antimicrobianos é uma característica marcante em biofilmes fúngicos. Células nessas associações toleram concentrações até 1000 vezes maiores de antifúngicos que células planctônicas (DIBONAVENTURA et al., 2006, SUN et al., 2012, ITURRIETA-GONZALEZ et al., 2014; LIAO et al., 2014; BAILIE e DOUGLAS, 2000; MURKHERJEE e CHANDRA, 2004; RAMAGE et al., 2012). A resistência a antifúngicos em biofilmes é

extremamente complexa e muitos mecanismos têm sido relacionados a esse fenômeno (RAMAGE et al., 2012; JABRA-RIZK et al., 2004; LAFLEUR et al., 2006; PERUMAL et al., 2007).

A resistência em crescimento planctônico é uma característica comumente observada em *Trichosporon* frente a anfotericina B (LIAO et al., 2014; WOLF et al., 2001), aos azólicos (FALK et al., 2003; SILVA et al., 2008), às equinocandinas (DIBONAVENTURA et al., 2006; LIAO et al., 2014) e até mesmo fenótipos resistente a múltiplos fármacos (WOLF et al., 2001; SANTOS et al., 2016). Pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de resistência expressos por *Trichosporon*. Kushima et al. (2012) reportaram a ocorrência de uma mutação associada ao fenótipo de resistência aos azólicos, no gene que codifica para a enzima 1,4 α -dimetilase, alvo de atuação dos antifúngicos azólicos.

Com relação aos biofilmes de *Trichosporon*, o mesmo fenótipo de tolerância é observado em altas concentrações de antifúngicos (DIBONAVENTURA et al., 2006; SUN et al., 2012; ITURRIETA-GONZALEZ et al., 2014; LIAO et al., 2014). Os resultados encontrados neste estudo mostraram o comportamento de tolerância dos biofilmes aos antifúngicos azólicos, com manutenção da atividade metabólica sob concentrações maiores que 1.024 vezes os valores de concentração inibitória mínima. Com relação à anfotericina B e caspofungina, os biofilmes apresentaram valores de concentração inibitória mínima em biofilme cerca de 2 vezes a 32 vezes maiores que a concentração inibitória mínima. Resultados semelhantes foram encontrados por Di Bonaventura et al. (2006), que relataram que embora as células planctônicas de *T. asahii* tenham sido sensíveis ao voriconazol e fluconazol, os biofilmes apresentaram alta tolerância aos azólicos, anfotericina B e caspofungina. Ainda, valores de concentração inibitória mínima em biofilmes semelhantes foram encontrados por Liao et al. (2014) para anfotericina B e caspofungina contra biofilmes de *T. asahii*.

Neste trabalho, a morfologia celular e ultraestrutura dos biofilmes produzidos por *T. inkin* foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. As imagens dos biofilmes dos sete isolados avaliados revelaram padrões semelhantes de morfologia das células. Como observado por Di Bonaventura et al. (2006) para biofilmes de *T. asahii* e Iturrieta-Gonzalez et al. (2014) para biofilmes de *T. asahii* e *T. asteroides*, biofilmes maduros de *T. inkin* consistiram em uma associação de células nas formas leveduriforme e filamentosa, organizadas em multicamadas e recobertas por material amorfo extracelular. O papel destas diferentes morfologias e arranjos celulares associados à presença de matriz no fenótipo dos

biofilmes, particularmente em relação à sensibilidade aos antifúngicos, devem ser investigados (DIBONAVENTURA et al., 2006).

A produção aumentada de enzimas proteolíticas é comumente observada em células fúngicas associadas em biofilmes (MENDES et al., 2007; BRAGA-SILVA e SANTOS, 2011), e é ainda mais pronunciada após exposição dos biofilmes a doses subinibitórias de fluconazol (MORES et al., 2009). Os resultados deste estudo mostraram que a atividade proteolítica ocorre durante todas as etapas do desenvolvimento dos biofilmes de *T. inkin*, inclusive durante as primeiras seis horas de adesão. Após 48 h e 72 h de cultivo, foi observada uma produção mais elevada dessas enzimas. O papel das proteases fúngicas tem sido estudado com detalhes em *C. albicans*. Já foi relatado que genes *SAPs* são superexpressos em células associadas em biofilmes *in vitro* (MENDES et al., 2007; NAILIS et al., 2010; SAMARANAYAKE et al., 2013) e *in vivo* (NAGLIK et al., 2008).

A principal função das proteases está relacionada com a degradação protéica, mas tem sido hipotetizado que podem ser importantes na adesão celular e aquisição de nutrientes em biofilmes maduros (NAILIS et al., 2010). No presente estudo, também foi observado que biofilmes de *T. inkin* produziram mais enzimas proteolíticas que células planctônicas. Resultados semelhantes foram encontrados por Mendes et al. (2007) em modelo *in vitro* de biofilmes de *C. albicans*. Embora pouco se saiba acerca da atividade proteolítica relacionada à biofilmes em *Trichosporon*, estes dados podem sugerir sua importância no desenvolvimento e maturação de biofilmes de *T. inkin*.

A produção de enzimas proteolíticas em células de *T. inkin* associadas em biofilmes pode estar relacionada não só apenas à formação e desenvolvimento dos biofilmes, mas também pode participar ativamente da patogenia deste fungo. Características fisiológicas das células quando associadas em biofilmes podem ser alvos importantes de atuação antifúngica para o controle destes biofilmes, e por conseguinte para a diminuição da adesão celular, resistência antimicrobiana e recorrência das infecções. Assim, a inibição destas proteases pode se tornar uma importante estratégia para o controle destes fungos quando associados em biofilmes. Uma vez que os antivirais inibidores de proteases podem inativar proteases fúngicas (CASSONE et al., 1999, KORTING et al., 1999; VON ZEPELIN et al., 1999), a segunda etapa experimental deste trabalho avaliou seu uso como alternativa de controle sobre a formação, desenvolvimento e resistência de células planctônicas e em biofilmes produzidos por duas espécies de *Trichosporon*.

A fim de determinar a melhor droga para os ensaios, foi avaliada a atividade antifúngica de cinco antivirais: Fosamprenavir, Atazanavir, Lopinavir+Ritonavir, Darunavir e Ritonavir

sobre o crescimento planctônico de isolados de *T. asahii* e *T. inkin*. Os resultados mostraram que apenas o ritonavir apresentou atividade antifúngica sobre o crescimento dos isolados de *T. asahii* e *T. inkin* (dados não mostrados). Deste modo, ritonavir foi o inibidor de proteases de escolha para os testes.

Duas horas após administração oral, o ritonavir apresenta ampla distribuição tecidual e atinge a concentração de pico plasmático humano de aproximadamente 10 µg/mL (FLEXNER et al., 1998). Assim, esta concentração foi utilizada como referência para os ensaios, com variação de até 20 vezes o valor da concentração de pico plasmático.

Na máxima concentração testada, o ritonavir inibiu em média, 95% do crescimento das quatro cepas testadas. Já o crescimento dos isolados de *Trichosporon* foi inibido em cerca de 50% na menor concentração subsequente testada. A atividade antifúngica do ritonavir já foi reportada contra diversas espécies fúngicas, tais como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* (MATA-ESSAYAG et al., 2000), além do fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (BRILHANTE et al., 2016). Além da inibição do crescimento, o ritonavir causa redução no diâmetro da cápsula em *C. neoformans* (SIDRIM et al., 2012), assim como reduz a produção de hifas em *C. albicans* (MELO et al., 2006).

No presente estudo, não foi observado sinergismo entre o ritonavir e os antifúngicos testados neste experimento. A interação farmacológica do RIT com antifúngicos foi mostrada por Migliorati et al. (2004), que observaram que a co-incubação do ritonavir em doses séricas no meio de cultura do teste de sensibilidade diminuíram os valores de concentração inibitória mínima para anfotericina B, 5-fluocitosina, cetoconazol, fluconazol e itraconazol em *T. capitatum*. Ainda, o ritonavir também reduziu os valores de CIM dos antifúngicos cetoconazol e itraconazol em isolados de *Candida*, deixando os isolados significativamente mais sensíveis na presença de doses séricas do RIT. Brilhante et al. (2016) observaram sinergismo do ritonavir e itraconazol frente a *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

A ocorrência de sinergismo com voriconazol não foi avaliada neste trabalho, de modo que o ritonavir prolonga a eliminação do voriconazol. Deste modo, a administração do voriconazol com o ritonavir é desaconselhada (MIKUS et al., 2006; FLEXNER, 1998).

O ritonavir é um peptídeo que se liga competitivamente ao sítio de clivagem das proteases virais, levando a formação de partículas virais incompletas, durante o ciclo de replicação (FLEXNER, 1998; DEMARCHI et al., 2012). As enzimas proteolíticas produzidas pelo HIV e por *Candida* pertencem à mesma superfamília de proteases aspárticas (SAPs) e apresentam o mesmo sítio catalítico (TSANG E HONG, 2009; SANTOS, 2010; SANTOS E

BRAGA-SILVA, 2013). Nesse cenário, os inibidores de proteases podem atuar diretamente como inibidores de proteases produzidas por fungos, como por exemplo *Candida* (KORTING et al., 1999; MONARI et al., 2005), *C. neoformans* (SIDRIM et al., 2012), e *Fonsecaea pedrosoi* (PALMEIRA et al., 2008).

Nossos resultados mostraram que o ritonavir inibiu a atividade proteolítica em crescimento planctônico de *T. asahii* e *T. inkin*, confirmando que esse potencial inibitório também ocorre em *Trichosporon*. Migliorati et al. (2004) é o primeiro relato da influência da presença do ritonavir sobre a atividade proteolítica em *T. capitatum* e, contrário aos resultados encontrados nesta pesquisa, RIT não alterou a atividade proteolítica. Esses resultados podem ser explicados de pelo fato que o isolado escolhido pelos autores não produziu proteases nem no controle positivo, além da avaliação em ágar apresentar diferenças metodológicas da análise em meio líquido utilizado neste experimento. Esses autores mostraram ainda que o ritonavir diminuiu a atividade proteolítica em isolados de *C. albicans*. De acordo com Von Zepellin et al. (1999), o ritonavir inibiu a atividade das Sap 1, Sap 2 e Sap 3 em *C. albicans* em concentrações próximas de 23 µg/mL. Sidrim et al. (2012) mostraram o potencial inibitório do RIT sobre as proteases produzidas por *C. neoformans* em concentrações e condições próximas as testadas em *Trichosporon*, neste experimento.

Para a avaliação da habilidade do RIT em interferir na capacidade de adesão celular em *Trichosporon*, um experimento piloto de influência do ritonavir sobre o inóculo inicial dos biofilmes foi realizado. Os resultados mostraram que o ritonavir, na concentração de 100 µg/mL, não diminuiu a carga fúngica inicial de 1×10^6 células/mL utilizada como inóculo, sem diferença com os controles ao longo da incubação por 72 h, avaliados por curva de crescimento. Estes resultados mostram que a redução de células aderidas ao substrato não se deu por morte celular do inóculo inicial, e sim, por alterações na interação célula-substrato (Dados não mostrados). Os resultados mostraram que o RIT na concentração máxima reduziu tanto a atividade metabólica quanto a biomassa das células aderidas ao substrato após o tempo de adesão celular, etapa fundamental no processo de estabelecimento dos biofilmes. Autores mostraram que o ritonavir diminuiu a adesão de *Candida* à células epiteliais (FALKENSAMMER et al., 2007; BEKTIC et al., 2001), entretanto, não foram encontrados relatos sobre a inibição da adesão celular em *Trichosporon* por RIT.

Além de inibir a adesão celular, o RIT também impediu a formação de biofilmes ao longo dos tempos de incubação dos mesmos. Os resultados mostraram que o ritonavir diminuiu em cerca de 95% a atividade metabólica dos biofilmes na concentração de 10 vezes

a dose sérica. Esses resultados sugerem o potencial do RIT como inibidor de um importante fator de virulência produzido por *Trichosporon*.

Embora o RIT tenha apresentado grande potencial como inibidor da formação dos biofilmes, o mesmo não foi observado para a atividade sobre biofilmes maduros de *Trichosporon*. Como mostrado neste trabalho, biofilmes produzidos por *Trichosporon* apresentam tolerância a compostos antifúngicos e inibidores do crescimento fúngico, como o ritonavir. Liao et al. (2014) mostrou que a atividade metabólica dos biofilmes de *T. asahii* foi reduzida com a combinação sinérgica de AMB e VRZ, entretanto, a combinação de VRZ/CAS e AMB/CAS foi significativamente menos efetiva sobre esses biofilmes. Biofilmes maduros de *T. asahii* foram reduzidos com a presença de 25% de etanol somente após 12h de exposição (LIAO et al., 2015). A habilidade de desestruturar associações celulares como os biofilmes tem destacada importância no controle de infecções persistentes, além da possível diminuição do fenótipo de resistência aos antifúngicos (RAMAGE et al., 2012; SHIN et al., 2002).

A primeira etapa deste trabalho mostrou que a atividade proteolítica é uma característica marcante em biofilmes produzidos por *T. inkin*. A inibição das enzimas proteolíticas pode ser uma importante estratégia para o controle destas associações (CASSONE et al., 1999, KORTING et al., 1999; VON ZEPELIN et al., 1999). Os resultados obtidos mostraram que o RIT inibiu significativamente as proteases produzidas em biofilmes maduros em *T. asahii* e *T. inkin*, o que corrobora com a diminuição da formação de biofilmes neste mesmo tempo de incubação. Esses resultados permitem sugerir que a inibição da formação de biofilmes pode estar, ao menos em parte, associada à inibição enzimática observada. Entretanto, cabe ressaltar que os biofilmes foram inibidos previamente, com 24 h de incubação, sem diferença na atividade proteolítica em biofilme nesse tempo. Esses dados sugerem que outros mecanismos de inibição dos biofilmes podem estar associados ao RIT.

Os inibidores de proteases como o RIT atuam pelo princípio de mimetismo peptídico no sítio de ligação das enzimas. Deste modo, os inibidores de proteases exibem diferentes níveis de atuação sobre as isoenzimas Saps (TSANG e HONG 2009; SANTOS et al., 2010). De modo que diferentes enzimas proteolíticas participam das etapas de adesão, maturação e fisiologia dos biofilmes de *Candida* (VON ZEPELIN et al., 1999; SANTOS, 2010), é razoável supor que o mesmo comportamento ocorra em biofilmes de *Trichosporon*. Embora pouco se saiba sobre as proteases de *Trichosporon*, é possível concluir que o ritonavir atua como um importante inibidor sobre as células e os biofilmes de *Trichosporon*, e pode atuar como um adjuvante no combate a estes fatores de virulência.

Muitos compostos estão presentes na matriz dos biofilmes fúngicos, dentre eles proteínas, carboidratos, enzimas e ácidos nucleicos (FLEMMING et al., 2007; ZARNOWSKY et al, 2014; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; MARTINS et al., 2010). A relação entre esses compostos associados à matriz confere características de proteção química e física aos biofilmes. O conhecimento dos componentes de matriz associados aos biofilmes permite a formação de estratégias de combate a essas estruturas. A composição de matriz dos biofilmes produzidos por *Trichosporon* ainda é pouco estudada. Lakshmi e Das (2013) mostraram que a matriz de biofilmes de *T. asahii* é composta de exopolissacarídeos que conferem proteção a agentes ambientais, além de ser visualizada durante a maturação dos biofilmes. Lee et al. (2016) mostraram que *T. asahii* apresenta os *clusters* de genes para biossíntese de galactosaminogalactana, um exopolissacarídeo importante para a formação de biofilmes, além de mostrarem a presença desse carboidrato associado a material extracelular associado às hifas fúngicas.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram um conjunto de picos protéicos associados à matriz de *T. asahii* e *T. inkin*, comprovando que proteínas também fazem parte da composição de matriz deste gênero. A matriz isolada dos biofilmes formados na presença do RIT apresentou dois picos não relacionados aos controles, em ambas espécies testadas. Um dos picos foi identificado como a proteína chamada Isopenicilina N-Sintase, que já foi previamente reportada em *T. asahii* CBS 8904 (YANG et al., 2012). Esta proteína está envolvida em uma etapa-chave na biossíntese da penicilina, ligando-se com o ferro e usando dióxidos como co-substratos na formação de anéis tiazolidinos e β -lactâmicos (ROACH et al., 1997; ROACH et al., 1995). Até o presente momento, o papel desta enzima sobre o metabolismo de *Trichosporon* não foi descrito, nem sua importância como componente de matriz. O outro pico observado apresentou uma sequência de aminoácidos pequena, sendo alinhada sem especificidade com diversas proteínas associadas à ordem *Trichosporonales*, incluindo *Cryptococcus* spp.

Uma vez que a co-incubação do ritonavir apresentou potencial inibitório sobre o crescimento, sobre a atividade proteolítica e sobre a adesão celular e a formação de biofilmes em *Trichosporon*, resolveu-se investigar quais os efeitos do ritonavir sobre as células de *Trichosporon* após uma pré-exposição. Deste modo, as células foram pré-expostas ao RIT durante 14 dias consecutivos, e após a lavagem e remoção do RIT, as células foram avaliadas quanto à alteração da sensibilidade, adesão e formação de biofilmes e hidrofobicidade celular.

Os resultados mostraram que a sensibilidade aos azólicos praticamente não foi alterada, mas a pré-exposição aumentou a sensibilidade dos isolados à anfotericina B. Este antifúngico

atua diretamente sobre o ergosterol presente na membrana, causando uma diminuição da permeabilidade, com posterior desequilíbrio eletrolítico e morte celular (GRAY et al., 2012). Migliorati *et al.* (2004) avaliaram o impacto da pré-exposição de células de *T. asahii* ao ritonavir em doses séricas, e mostraram que a pré-exposição durante dois dias diminuiu os valores de CIM para fluconazol, 5-fluocitosina e anfotericina B. Estes autores avaliaram a sensibilidade aos antifúngicos pelo método de E-test, com a presença do ritonavir no ágar de cultivo prévio ao teste de sensibilidade, métodos estes que divergem dos empregados neste estudo. O mecanismo de ação do ritonavir sobre as células de *Trichosporon* não foi elucidado, mas os dados permitem sugerir que a pré-exposição gera algum grau de mudança fisiológica e/ou estrutural nas células.

Em virtude do comportamento diferenciado das células pré-expostas na adesão celular, foi avaliada a alteração na hidrofobicidade celular em *Trichosporon* causada pela pré-exposição ao ritonavir. Os resultados mostraram que somente a pré-exposição diminuiu a hidrofobicidade celular, o que diminuiu a interação célula-substrato. Dostalkova et al. (2015) mostraram a influência do meio de cultivo na hidrofobicidade celular em *T. asahii*, e concluíram que células cultivadas em meio complexo tiveram comportamento celular superficial mais hidrofóbico que as cultivadas em meio mínimo. Estes mesmos autores mostraram que células mais hidrofóbicas aderiram e colonizaram superfícies de celofane com caráter hidrofóbico. A hidrofobicidade tem uma correlação positiva com a habilidade de adesão à superfícies, como já descrito para *Candida* (ANIL et al., 2001; TSANG e HONG 2009, BUJDAKOVA et al., 2013).

O presente estudo mostrou que os biofilmes de *T. inkin* podem ser formados sob diferentes condições experimentais, mesmo em meios com menor concentração de nutrientes. Os biofilmes apresentam a habilidade de liberar constantemente células viáveis para o meio externo, bem como ácidos nucléicos ao longo do seu desenvolvimento. Biofilmes de *T. inkin* apresentam tolerância a altas concentrações de antifúngicos e produzem proteases extracelulares. Estas características de formação de biofilmes podem ter importância clínica durante infecções por *T. inkin*. Devido à importância clínica de biofilmes de fungos e a produção pronunciada de proteases nessas comunidades, o uso do ritonavir mostrou-se um promissor inibidor enzimático em crescimento planctônico e em biofilmes, como inibiu o crescimento, a adesão e formação de biofilmes, além de modificar o perfil protéico da matriz e a morfologia ultraestrutural dos biofilmes. O RIT não só desempenhou papel atuante na fisiologia de *Trichosporon*, como modulou a sensibilidade à anfotericina B e a interação célula-substrato após a pré-exposição, em parte, por diminuição da hidrofobicidade celular.

9 CONCLUSÕES

- *Trichosporon inkin* forma biofilmes em diferentes condições de cultivo e incubação, com maior biomassa formada em meio RPMI em pH 7,0, com inóculo inicial de 1×10^6 células/mL, e incubação a 35°C e 80 rpm;
- A maturidade dos biofilmes ocorre em 48h de cultivo, e a liberação de células viáveis e ácidos nucleicos ocorre durante todo o desenvolvimento;
- Os biofilmes de *T. inkin* são compostos de blastoconídeos, artroconídeos, hifas e pseudo-hifas associadas em multicamadas e toleram altas doses de anfotericina B, caspofungina e azólicos;
- A atividade proteolítica é maior em biofilmes de *T. inkin*, em comparação às células planctônicas;
- O crescimento e a atividade proteolítica de *T. asahii* e *T. inkin* em crescimento planctônico diminuíram na presença do ritonavir, mas não houve interação sinérgica com os antifúngicos;
- A co-incubação das células com o ritonavir diminuiu a adesão celular, a atividade metabólica, a biomassa e a morfologia ultraestrutural durante a formação dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, mas não interferiu em biofilmes maduros;
- O ritonavir diminuiu a atividade proteolítica em biofilmes maduros de *T. asahii* e *T. inkin* de forma dose e tempo-dependente, além de alterar a composição protéica da matriz dos biofilmes;
- A pré-exposição das células de *T. asahii* e *T. inkin* ao ritonavir aumentou a sensibilidade à anfotericina B, diminuiu a adesão celular e a hidrofobicidade celular de *T. asahii* e *T. inkin*.

REFERÊNCIAS

ABU-ELTEEN, K. H.; HAMAD, M. A. Changing epidemiology of classical and emerging human fungal infections: a review. **Jord. J. Biol. Sci.**, v. 5, n. 4, p. 215-230, 2012.

AJESH, K.; SREEJITH, K. *Cryptococcus laurentii* biofilms: structure, development and antifungal drug resistance. **Mycopathol.**, v. 174, p. 409-419, 2012.

ALEXIEVA, Z.; GERGINOVA, M.; MANASIEV, J.; ZLATEVA, P.; SHIVAROVA, N.; KRASTANOV, A. Phenol and cresol mixture degradation by the yeast *Trichosporon cutaneum* **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, n. 11, p. 1297-1301, 2008.

AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 8, p. 999-1008, 2006.

ALMEIDA, A.A.; CRISPIM, B.A.; GRISOLIA, A.B.; SVIDZINSKI, T.I.E.; ORTOLANI, L.G.; DE OLIVEIRA, K.M.P. Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 62-66, 2016.

ALMEIDA, A.A.; CRISPIM, B.A.; GRISOLIA, A.B.; SVIDZINSKI, T.I.E.; ORTOLANIA, L.G.; OLIVEIRA, K.M.P.; Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients **Ver. Argent. Microbiol.** p. 48, n.1, p. 62-66, 2016.

ANIL, S.; ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. **Oral Dis.**, v. 7, n. 2, p. 119-122, 2001.

ANITHA, S.; PREMAMALINI, T.; JYOTI, K. A. Virulence factors among *Trichosporon* species from clinical isolates in a tertiary care centre **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 4, n. 8, p. 493-501, 2015.

ASENCIO, M.A.; GARDUNO, E.; PEREZ-GIRALDO, C.; BLANCO, M.T.; HURTADO, C.; GOMEZ-GARCIA, A.C. Exposure to therapeutic concentrations of ritonavir, but not saquinavir, reduces secreted aspartyl proteinase of *Candida parapsilosis*. **Chemother.** v. 51, n. 5, p. 252-255, 2005.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, n. 3, p. 397-403, 2000.

BEKTIĆ, J.; LELL, C.P.; FUCHS, A.; STOIBER, H.; SPETH, C.; LASS- FLÖRL, C.; BORG, V. Z. M.; DIERICH, M. P.; WÜRZNER, R. HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells *in vitro*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 31, n. 1, p. 65-71, 2001.

BENTUBO, H. D. L; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the *in vitro* expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **Springer Plus**, v. 3, n. 1, p. 377, 2014.

BIEMANN, K. Mass Spectrometry of Peptides and Proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 61, n. 1, p. 977-1010, 1992.

BLANCO, M. T.; HURTADO, C.; PEREZ-GIRALDO, C.; MORAN, F. J.; GONZALEZ-VELASCO, C.; GÓMEZGARCÍA, A. C. Effect of ritonavir and saquinavir on *Candida albicans* growth rate and *in vitro* activity of aspartyl proteinases. **Med. Mycol.**, v. 41, n. 2, p. 167-170, 2003.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 9, p. 588-594, 2006.

BORGHI, E.; SCIOTA, R.; BIASSONI, C.; CIRASOLA, D.; CAPPELLETTI, L.; VIZZINI, L.; BORACCHI, P.; MORACE, G. Cell surface hydrophobicity: a predictor of biofilm production in *Candida* isolates? **J. Med. Microbiol.**, v. 60, n. 5, p. 689-690, 2011.

BRAGA-SILVA, A. L.; SANTOS, A. L. S. A. Aspartic protease inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, n. 16, p. 2401-2419, 2011.

BRAGA-SILVA, L. A.; MOGAMI, S. S.; VALLE, R. S.; SILVA-NETO, I. D.; SANTOS, A. L. Multiple effects of amprenavir against *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res.**, v. 10, n. 2, p. 221-224, 2010.

BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, E. P.; RIELLO, G. B.; GUEDES, G. N. M. M.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; FECHINE, M. A. B.; OLIVEIRA, J. S.; CAMARGO, Z. P.; MESQUITA, J. R. L.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Antiretroviral drugs saquinavir and ritonavir reduce inhibitory concentration values of itraconazole against *Histoplasma capsulatum* strains *in vitro*. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 20, n. 2, p. 155-159, 2016.

BUJDÁKOVÁ, H.; DIDIÁŠOVÁ, M.; DRAHOVSKÁ, H.; ČERNÁKOVÁ, L. Role of cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* biofilm. **Cent. Eur. J. Biol.**, v. 8, n. 3, p. 259-262, 2013.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; COCCIOLI, C.; CAMARDA, A.; OTRANTO, D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. **Med. Mycol.**, v. 46, n. 5, p. 429-434, 2008.

CARVALHO, M. H. G. F.; SANTOS, F. B.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA-PAESA, R. L-dihydroxyphenylalanine induces melanin production by members of the genus *Trichosporon*. **FEMS Yeast Res.**, v. 14, n. 6, p. 988-991, 2014.

CASSONE, A.; BERNARDIS, F.; TOROSANTUCCI, A.; TACCONELLI, E.; TUMBARELLO, M.; CAUDA, R. *In vitro* and *in vivo* anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 448-453, 1999.

CASSONE, A.; TACCONELLI, E.; DE BERNARDIS, F.; TUMBARELLO, M.; TOROSANTUCCI, A.; CHIARI, P.; CAUDA, R. Antiretroviral therapy with protease inhibitors has an early, immune reconstitution-independent beneficial effect on *Candida*

virulence and oral candidiasis in human immunodeficiency virus–infected subjects. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 2, p. 188-195, 2002.

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

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L., MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Int. J. Eng. Sci. Technol.**, v. 2, n. 12, p. 6942-6953, 2010.

CHANG, H. C.; CHANG, J. J.; HUANG, A. H.; CHANG, T. C. Evaluation of a capacitance method for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 971-976, 2003.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J. Biol. Chem.**, v. 171, p. 501-505, 1947.

CHO, O.; MATSUKURA, M.; SUGITA, T. Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 39, n. 14, p. 87-88, 2015.

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.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts – Supplementar Material** - Approved Standard, 3rd ed. M27-S4. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, n. 1, p. 25-30, 2007.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 4, p. 682–700, 2011.

CORDEIRO, R. A.; EVANGELISTA, A. J. J.; SERPA, R.; MARQUES, F. J. F.; MELO, C. V. S.; OLIVEIRA, J. S.; FRANCO, J. S.; ALENCAR, L. P.; BANDEIRA, T. J. P. G.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiol.**, v. 162, n. 2, p. 309-317, 2016.

COSTA, T. O. G.; ALMEIDA, R. A.; MELO, J. T.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; LEITE, J. R. S. A.; PRATES, M. V.; BLOCH JR., C.; PINTO, A. C. Isolation and Amino Acid Sequencing by MALDI-TOF-MS/MS of a Novel Antimicrobial Anionic Peptide from the Skin Secretion of *Osteocephalus taurinus* (Anura, Hyliidae). **J. Braz. Chem. Soc.** v.23, n. 12, 2133-2136, 2012.

COTTER, J. J.; O’GARA, J. P.; CASEY, E. Rapid depletion of dissolved oxygen in 96-well microtiter plate *Staphylococcus epidermidis* biofilm assays promotes biofilm development and is influenced by inoculum cell concentration. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 103, p. 1042-1047, 2009.

DAĞ, A.; ÇERİKÇİOĞLU, N. Investigation of some virulence factors of *Trichosporon asahii* strain isolated from the clinical sample of hospitalized patients. **Mikrobiyol. Bull.** v. 40, n. 3, p. 225-235, 2006.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2^a ed. Universitat Rovira i Virgili, Spain, 2000.

DEMARCHI, I. G.; CARDOZO, D. M.; ARISTIDES, S. M. A.; MOLITERNO, R. A.; SILVEIRA, T. G. V.; CARDOSO, R. F.; BERTOLINI, D. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; TEIXEIRA, J. J. V.; LONARDONI, M. V. C. Activity of antiretroviral drugs in human infections by opportunistic agents. **Braz. J. Pharm. Scien.**, v. 48, n. 1, p. 171-185, 2012.

DI BONAVENTURA, G.; POMPILIO, A.; PICCIANI, C.; IEZZI, M.; D'ANTONIO, D.; PICCOLOMINI, R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture and antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 10, p. 3269-3276, 2006.

DOSTALKOVA, J.; PROCHAZKOVA, G.; JIRKŮ, V.; KŘIKLAVOVA, L.; LEDERER, T.; SUCHANEK, M.; BRANYIK, T. Physicochemical aspects of *Trichosporon cutaneum* CCY 30-5-10 adhesion and biofilm formation potential on celofane. **Chem. Papers.**, v. 69, n. 3, p. 425-432, 2015.

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, p. 139-143, 2002.

EKLUND, M. W.; SPINELLI, J.; MIYAUCHI, D.; GRONINGER, H. Characteristics of yeasts isolated from Pacific crab meat. **Appl. Microbiol.**, v. 13, n. 6, p. 985-990, 1965.

EL-MASHAD, N.; MAHMOUD, M. T.; EL-SHEWEHY, A. H. *Trichosporon* identification methods for isolates obtained from different clinical specimens. **Afr. J. Microbiol. Research.**, v. 5, n. 9, p. 1097-1101, 2011.

EMRI, T.; MAJOROS, L.; TÓTH, V.; PÓCSI, I. Echinocandins: production and applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, n. 8, p. 3267-3284, 2013.

FALK, R.; WOLF, D. G.; SHAPIRO, M.; POLACHECK, I. Multidrug-Resistant *Trichosporon asahii* isolates are susceptible to voriconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 911, 2003.

FALKENSAMMER, B.; PILZ, G.; BEKTIC, J.; IMWIDTHAYA, P.; JOHRER, K.; SPETH, C.; LASS-FLORL, C.; DIERICH, M. P.; WURZNER, R. Absent reduction by HIV protease inhibitors of *Candida albicans* adhesion to endothelial cells. **Mycoses**, v. 50, p. 172-177, 2007.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FINKEL, J.S.; XU, W.; HUANG, D.; HILL, E.M.; DESAI, J.V.; WOOLFORD, C.A.; NETT, J.E.; TAFF, H; NORICE, C.T.; ANDES, D.R.; LANNI, F.; MITCHELL, A.P. Portrait of *Candida albicans* Adherence Regulators. **PLoS Pathog.** v.8, n.2, e1002525. 2012.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 22, p. 7945-7947, 2007.

FLEXNER, C. HIV-protease inhibitors. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 18, p. 1281-1292, 1998.

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, n. 6, p. 496-505, 2009.

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 Gen. Biol.** v.46, n. 6, p.496–505, 2009.

FOX, A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: past, present, and future. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, n. 8, p. 2677-2680, 2006.

FOX, E.P.; NOBILE, C.J. The role of *Candida albicans* biofilms in human disease (2003). In: DIETRICH, L.A.; FRIEDMAN, L.A. ***Candida albicans: Symptoms, Causes and Treatment Options***. Nova Science Publishers, Inc. 2003.

GAAL, A.; NEUJAHN, H.Y. Metabolism of phenol and resorcinol in *Trichosporon cutaneum*. **J. Bacteriol.**, v. 137, n. 1, p. 13-21, 1979.

GACSER, A.; FRANK, E.; KROGER, C.; KREDICS, L.; SCHAFFER, W.; NOSANCHUK, J.D. Lipase 8 affects pathogenesis of *Candida albicans*. **Infect. Immun.** v. 75, n. 10, p. 4710-4718, 2007.

GARCIA-MARTOS, P.; DOMINGUES, I.; MARIN, P.; GARCIA-AGUDO, R.; AOUFI, S.; MIRA, J. Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. **Enferm. Infec. Microbiol. Clín.**, v. 19, n. 6, p. 249-256, 2001.

GARCIA-SANCHEZ, S.; AUBERT, S.; IRAQUI, I.; JANBON, G. *Candida albicans* biofilms: A developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. **Eukaryot. Cell.** v. 3, p. 536–45, 2004.

GIRMENIA, C.; PAGANO, L.; MARTINO, B.; D'ANTONIO, D.; FANCI, R.; SPECCHIA, G.; MELILLO, L.; BUELLI, M.; PIZZARELLI, G.; VENDITTI, M.; MARTINO, P. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 4, p. 1818–1828, 2005.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathol.** v.164, p. 265–269, 2007.

GOODMAN, D.; PAMER, E.; JAKUBOWSKI, A.; MORRIS, C.; SEPKOWITZ, K. Breakthrough *Trichosporonosis* in a bone marrow transplant recipient receiving caspofungin acetate. **Clin. Infec. Dis.**, v. 35, n. 3, p. e35-e36, 2002.

GRAY, K.C.; PALACIOS, D.S.; DAILEY, I.; ENDO, M.M.; UNO, B.E.; WILCOCK, B.C.; BURKE, M.D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol **PNAS**, v.109, n. 7, 2012.

GRONINGER, H. S. JR.; EKLUND, M. W. Characteristics of a proteinase of a *Trichosporon* species isolated from dungeness crab meat. **Appl. Microbiol.** v. 14, n. 1, p. 110 -114, 1966.

GULATI, M.; NOBILE, C.J. Clarissa J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microb. Infect.**, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

GUO, L.N.; XIAO, M.; KONG, F.; CHEN, S.C.A.; WANG, H.; SORRELL, T.C. JIANG, W.; DOU, H.T.; LI, R.Y. XU, Y.C. Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 11, p. 3805-3811, 2011.

HASAN, F.; XESS, I.; WANG, X.; JAIN, N.; FRIES, B.C. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microb. Infec.** v. 11, n. 8, p. 753-761, 2009.

HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. **Infec. Immun.** v. 62, p. 915-921, 1994.

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

ITURRIETA-GONZALEZ, 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.1-10, 2014.

JABRA-RIZK, M.A.; FALKLER, W.A.; MEILLER, T.F. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerg. Infec. Dis.** v.10, p.14–19, 2004.

JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C.; BARBOSA, J.O.; ROSSONI, R.D.; VILELA, S.F.G.; COSTA, A.C.B.P.; PRIMO, F.L.; GONÇALVES, J.M.; TEDESCO, A.C.; SULEIMAN, J.M.A.H. Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides* and *Kodamaea ohmeri*, by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis (phenyltio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). **Lasers Med. Sci.**, v. 27, n. 6, p. 1205-1212, 2012.

KANAFANI, Z.A.; PERFECT, J.R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis.** v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

KIEVIT, T.R.; IGLEWSKI, B.H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships **Infect. Immun.** v. 68, n. 9, P. 4839-4849, 2000.

KOLECKA, A.; KHAYHAN K.; GROENEWALD M.; THEELEN B.; ARABATZIS M.; VELEGRAKI A.; KOSTRZEWA M.; MARES M.; TAJ-ALDEEN S.J.; BOEKHOUT T. Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-Assisted laser desorption ionization-Time of Flight mass spectrometry. **J. Clin. Microbiol.** v. 51, n. 8, p. 2491–2500, 2013.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1135-1144, 2002.

KONTOYIANNIS, D.P; TORRES, H.A; CHAGUA, M.; HACHEM, R.; TARRAND, J.J.; BODEY, G.P.; RAAD, I.I. *Trichosporonosis* in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. **Scand J Infect Dis.** v. 36, n. 8, p. 564–569, 2004.

KORTING, H.C.; SCHALLER, M.; EDER, G.; HAMM, G.; BÖHMER, U.; HUBE, B. Effects of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) proteinase Inhibitors saquinavir and indinavir on *in vitro* activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-Infected Patients. **Antimicrob. Agents. Chemother**, vol. 43, n. 8, p. 2038, 1999.

KRCMERY, J.R.V.; MATEIČKA, F.; KUNOVÁ, A.; ŠPÁNIK, S.; GYARFÁŠ, J.; SYČOVÁ, Z.; TRUPL, J. Hematogenous *Trichosporonosis* in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. **Support. Care Cancer.**, v. 7, n. 1, p. 39–43, 1999.

KRCMERY, V.; LAHO, L.; HUTTOVA, M.; ONDRUSOVA, A.; KRALINSKY, K.; PEVALOVA, L.; DLUHOLUCKY, S.; PISARCÍKOVA, M.; HANZEN, J.; FILKA, J.; SEJNOVA, D.; LISKOVÁ, A.; PURGELOVÁ, A.; SZOVENYOVÁ, Z.; PAVOL, K. Aetiology, antifungal susceptibility, risk factors and outcome in 201 fungaemic children: data from a 12-year prospective national study from Slovakia. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, n.2, p.110-116, 2002.

KUHN, D.M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, n.1, p. 506-508, 2003.

KULAKOVSKAYA, T.V.; GOLUBEV, W.I.; TOMASHEVSKAYA, M.A.; KULAKOVSKAYA, E.V.; SHASHKOV, A.S.; GRACHEV, A.A.; CHIZHOV, A.S.; NIFANTIEV, N.E. Production of antifungal cellobiose lipids by *Trichosporon porosum*. **Mycopathol.**, v. 169, n. 2, p. 117-123, 2010.

KUMAMOTO, C.A. *Candida* biofilms. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 5, p. 608–611, 2002.

KUSHIMA, H.; TOKIMATSU, I.; ISHII, H.; KAWANO, R.; SHIRAI, R.; KISHI, K. Cloning of the lanosterol 14- alpha-demethylase (*ERG11*) gene in *Trichosporon asahii*: a possible association between G453R amino acid substitution and azole resistance in *T. asahii*. **FEMS Yeast Res.** v.12, n. 6, p. 662–667, 2012.

KUSTIMUR, S.; KALKANCI, A; CAGLAR, K.; DIZBAY, M.; AKTAS, F.; SUGITA, T. Nosocomial fungemia due to *Trichosporon asteroides*: firstly described bloodstream infection. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 43, n. 2, p. 167–170, 2002.

LAFLEUR, M.D.; KUMAMOTO, C.A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.50, p. 3839–3846. 2006.

LAKSHMI, V.; DAS, N. Caffeine degradation by yeasts isolated from caffeine contaminated samples. **Int. J. Sci. Nature.** v. 1, n 1, p. 47 - 52, 2011.

LAKSHMI, V.; DAS, N. Removal of caffeine from industrial wastewater using *Trichosporon asahii*. **J. Environ Biol.** v. 34, n 4, p. 701 – 708, 2013.

LATTIF, A.A.; MUKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J.; SWINDELL, K.; LOCKHART, S.R.; DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; GHANNOUM, M.A. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. **Int. J. Med. Microbiol.** v. 300, p. 265–270. 2010.

LEE, M.J.; GELLER, A.M.; BAMFORD, N.C.; LIU, H.; GRAVELAT, F.N.; SNARR, B.D.; LEMES, R.M.L.; LYON, J.P.; MOREIRA, L.M.; RESENDE, M.A.; Antifungal susceptibility profile of *Trichosporon* isolates: correlation between CLSI and ETEST methodologies. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 310-315, 2010.

LI, H.; LU, Q.; WAN, Z.; ZHANG, J. *In vitro* combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. **Int. J. Antimicrob. Agent.**, v. 35, n. 6, p. 550–552, 2010.

LIAO, Y.; HARTMANN, T.; ZHENG, T.; YANG, R.Y.; AO, J.H.; WANG, W.L. Breakthrough *Trichosporon*osis in patients receiving echinocandins: case report and literature review. **Chin. Med. J.**, v. 125, n. 14, p. 2632-2635, 2012.

LIAO, Y.; LU, X.; YANG, S.; LUO, Y.; CHEN, Q.; YANG, R. Epidemiology and outcome of *Trichosporon* fungemia: a review of 185 reported cases from 1975 to 2014. In: **Open forum infectious diseases**, v. 2, n. 4. Oxford University Press, 2015b.

LIAO, Y.; YANG, S.; CONG, L.; LU, X.; AO, J.; YANG, R. *In vitro* activities of antifungal combinations against biofilms and planktonic forms of clinical *Trichosporon asahii* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 12, p. 7615–7616, 2014.

LIAO, Y.; ZHAO, H.; LU, X.; YANG, S.; ZHOU, J.; YANG, R. Efficacy of ethanol against *Trichosporon asahii* biofilm *in vitro*. **Med. Mycol.**, v. 53, n. 4, p. 396-404, 2015.

LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; KLOCK, C.; OLIVEIRA, L.T.; DAL FORNO, N.R. *Trichosporon inkin* peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis with bibliography review. **Mycopathol.** v. 139, p. 15–18. 1997.

LYMAN C. A.; DEVI S. J.; NATHANSON J.; FRASCH, C. E.; PIZZO, P. A.; WALSH, T. J. Detection and quantification of the glucuronoxylomannan like polysaccharide antigen from clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigeli*: implications for pathogenicity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 1, p. 126–130, 1995.

LYMAN, C.A.; GARRETT, K.F.; PIZZO, P.A.; WALSH, T.J. Response of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes to *Trichosporon beigelii*: host defense against an emerging pathogen. **J. Infect. Dis.**, v. 170, n. 6, p. 1557–1565, 1994.

MAGALHÃES, A.R.; MONDINO, S.S.B.; SILVA, M. D.; NISHIKAWA, M.M. Morphological and biochemical characterization of the aetiological agents of white piedra. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 103, n. 8, p. 786-790, 2008.

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 Pathog.**, v. 11, n. 7, p. e1004982, 2015.

MARKLEIN, G.; JOSTEN, M.; KLANKE, U.; MÜLLER, E.; HORRÉ, R.; MAIER, T.; WENZEL, T.; KOSTRZEWA, M.; BIERBAUM, G.; HOERAUF, A. SAHL, H.G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 9, p. 2912-2917, 2009.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006.

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, n. 1, p. 80-85, 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. **Mycopathol.** v. 169, n. 5, p. 323–331, 2010.

MATA-ESSAYAG, S.; MAGALDI, S.; CAPRILES, C.H.; DEIBIS, L.; VERDE1, G.; PEREZ, C. *In vitro* antifungal activity of protease inhibitors. **Mycopathol.**, v. 152, p.135–142, 2000.

MAUFF, F.L.; CHABOT, J.; RALPH, B.; OSTAPSKA, H.; LEHOUX, M.; CERONE, R.P.; BAPTISTA, S.D.; VINOGRADOV E.; STAJICH, J.E.; FILLER, S.G.; HOWELL, L.; SHEPPARD, D.C. Deacetylation of Fungal Exopolysaccharide Mediates Adhesion and Biofilm Formation **MBIO**, v.7, n.2, e00252-16, 2016.

MELO, N.R.; VILELA, M.M.S.; JUNIOR, J.J.; KAMEI, K.; MIYAJI, M.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; GROENEVELD, P.; KELLY, S.L.; TAGUCHI, H. Hiv-1 anti-retroviral drug effect on the *C. albicans* hyphal growth rate by a bio-cell tracer system. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p.225-229, 2006.

MENDES, A.; MORES, A.U.; CARVALHO, A.P.; ROSA, R.T.; SAMARANAYAKE, L.P.; ROSA, E.A.R. *Candida albicans* biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 9, p. 1813-1815, 2007.

MENEZES, E.A.; MARINHO, J.A.S.; ÂNGELO, M.R.F.; CUNHA, M.C.S.O.; CUNHA, F.A.; JUNIOR, A.A.V. Isolation and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* in ceará, Brazil. **Rev. Bras. Instit. Med. Trop.**, v. 54, n. 1, p. 1-3, 2012.

MICELI, M.H.; DÍAZ, J.A.; LEE, S.A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect. Dis.**, v. 11, n. 2, p. 142–151, 2011.

MIDDELHOVEN, W.J. Identification of clinically relevant *Trichosporon* species. **Mycoses**, v. 46, n. 1-2, p. 7-11, 2003.

MIGLIORATI, C.A.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E.; LAUDERDALE, F. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 98, n. 3, p. 301-310, 2004.

MIKUS, G.; SCHOWEL, V.; DRZEWINSKA, M. Potent cytochromeP450 2C19 genotype-related interaction between voriconazoleand the cytochrome P450 3A4 inhibitor ritonavir. **Clin. Pharmacol. Ther.**v. 80, p. 126–35, 2006.

MILLER, M.B.; BASSLER, B.L. *Quorum sensing* in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 55, p. 165-99, 2001.

MONARI, C.; PERICOLINI, E.; BISTONI, G.; CENCI, E.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Influence of indinavir on virulence and growth of *Cryptococcus neoformans*. **J. Infect. Dis.**, v. 191, p. 307–311, 2005.

MONOD, M.; BORG-VON ZEPPELIN, M.; TELENTI, A.; SANGLARD, D. The inhibition of *Candida albicans* secreted aspartic proteases by three different HIV protease inhibitors. **Dermatol.** v. 198, n. 4, p. 412-414, 1999.

MONTEIRO, A. S.; MIRANDA, T. T.; LULA, I.; DENADAI, A. M. L.; SINISTERRA, R. D.; SANTORO, M. M.; SANTOS, V. L. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfaces by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72. **Col. Surf.Biointerf.** v. 84, n. 2, p. 467–476, 2011.

MONTOYA, A.M.; GONZÁLEZ, A.S.; PALMA-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. **Med. Mycol.**, 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.

MORES, A.L.; SOUZA, R.D.; CAVALCA, L.; CARVALHO, A.P.; GURSKY, L.C.; ROSA, R.T.; SAMARANAYAKE, L.P.; ROSA, E.A.R. Enhancement of Secretory Aspartyl Protease production in biofilms of *Candida albicans* exposed to sub-inhibitory concentrations of fluconazole. **Mycoses** 54, 195–201, 2009.

MORETTI-BRANCHINI, M.L.; FUKUSHIMA, K.; SCHREIBER, A.Z.; ISHIMURA, K.; PAPAORDANOU, P.M.; TRABASSO, P.; TANAKA, R.; MIYAJI, M. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 39, n. 3, p. 161-164, 2001.

MORTBERG M.; NEUJAHN H. Y. Uptake of Phenol by *Trichosporon cutaneum*. **J. Bacteriol.**, v. 161, n. 2, p. 615-619, 1985.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathog.** n.4, p.1-12, 2008.

MURKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resist. Updat.** v.7, p. 301–309. 2004.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**, 6^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 947 p.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.

NAGLIK, J.R.; MOYES, D.; MAKWANA, J.; KANZARIA, P.; TSICHLAKI, E.; WEINDL, G.; TAPPUNI, A.; RODGERS, A.; WOODMAN, A.; CHALLACOMBE, S. J.; SCHALLER, M.; HUBE, B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiol.**, v. 154, n. 11, p. 3266–3280, 2008.

NAILIS, H.; KUCHARÍKOVÁ, S.; ŘIČICOVÁ, M.; DIJCK, P. V.; DEFORCE, D.; NELIS, H.; COENYE, T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. **BMC Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2010.

NETSVYETAYEVA, I.; SWOBODA-KOPEC, E.; PACZEK, L.; FIEDOR, P.; SIKORA, P.; JAWORSKA-ZAREMBA, M.; BLACHNIO, S.; LUCZAK, M. *Trichosporon asahii* as a prospective pathogen in solid organ transplant recipients. **Mycoses**, v.52, p.263–265, 2008.

NETT, J. E.; GUTE, K.M.; RINGEISEN, A.; HOLOYDA, K.A.; ANDES, D.R. Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, v. 52, n. 9, p. 3411–3413, 2008.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; MEYER, W. Melanin production at 37°C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa. **Aust. Mycol.**, v. 28, p. 9-14, 2009.

NING, Y.; HU, X.; LING, J.; DU, Y.; LIU, J.; LIU, H.; PENG, Z. *Candida albicans* survival and biofilm formation under starvation conditions. **Int. Endod. J.** v. 46, n.1, p.62-70, 2013.

NORA, B.A.; ZOPPAS, B.A.; STEFANI, M., RIBEIRO, R.G.; GARRAFIEL, M.B. Piedra branca extragenital: relato de um caso no RS. **An. Bras. Dermat.**, v. 77, n. 4, p. 473-477, 2002.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J Antimicrob. Chemoth.**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.

ORTEGA-SPRINGALL, M.F.; ARROYO-ESCALANTE, S.; ARENAS, R. Onycholysis and Chromonychia: A Case Caused by *Trichosporon inkin*. **Skin App. Disor.**, v. 1, n. 3, p. 144-146, 2015.

PALMEIRA, V.V.; KNEIPP, L.F.; ROZENTAL, S.; ALVIANO, C.S.; SANTOS, A.L.S. Beneficial effects of HIV peptidase inhibitors on *Fonsecaea pedrosoi*: promising compounds to arrest key fungal biological processes and virulence **PLoS ONE**, v. 3, n.10, p. e3382. 2008.

PAPHITOU, N.I., OSTROSKY-ZEICHNER, L., PAETZNICK, V.L., RODRIGUEZ, R., CHEN, E. REX, J.H. *In vitro* antifungal susceptibility of *Trichosporon* species. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, v. 46, n. 4, p. 1144-1146, 2002.

PARKER, J.E; WARRILOW, A.G.; PRICE, C.L.; MULLIS. J.G.; KELLY, D.E.; KELLY, S.L. Resistance to antifungals that target CYP51. **J. Chem. Biol.**, v. 7, n. 4, p. 143-161, 2014.

PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J. Microbiol. Methods.**, v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.

PEREIRA, D.N.; NADER, S.S.; NADER, P.; MARTINS, P.G.; FURLAN, S.P.; HENTGES, C.R. Disseminated *Trichosporon* spp infection in preterm newborns: a case report. **J. Pediat.**, v. 85, n. 5, p. 459-461, 2009.

PERUMAL, P.; MEKALA, S.; CHAFFIN, W.L. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilm. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 2454–2463, 2007.

PETTIT, R.K.; REPP, K.K.; HAZEN, K.C. Temperature affects the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents. **Med. Mycol.**, v. 48, n. 2, p. 421-426, 2010.

PUSATERI, C.R.; MONACOA, E.A.; EDGERTON, M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. **Arch. Oral Biol.** v. 5, p. 588–594, 2009.

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 Microbiol.** v. 14, p. 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 **Eukaryot. Cell.** v. 12, n. 3, p. 420–429, 2013.

RAMAGE, G., RAJENDRAN, R., SHERRY, L., WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Inter. J. Microbiol.**, v. 2012, 2012.

RIBEIRO, M.A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; GOMEZ-LOPEZ, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Molecular identification and susceptibility testing of *Trichosporon* isolates from a Brazilian hospital. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, n. 4, p. 221-225, 2008.

RICHINI-PEREIRA, V.B.; CAMARGO, R.M. P.; BAGAGLI, E.; MARQUES, A.S. White piedra: molecular identification of *Trichosporon inkin* in members of the same family. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 3, p. 402-404, 2012.

RIEGER, C.; GEIGER, S.; HEROLD, T.; NICKENIG, C.; OSTERMANN, H. Breakthrough infection of *Trichosporon asahii* during posaconazole treatment in a patient with acute myeloid leukaemia. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.26, n. 11, p.843-845, 2007.

ROACH, P.L.; CLIFTON, I.J.; FULOP, v.; HARLOS, K.; BARTON, G.J.; HAJDU, J.; ANDERSON, I.; SCHOFIELD, C.J.; BALDWIN, J.E. Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. **Nature**. v. 375, p. 700-4, 1995.

ROACH, P.L.; CLIFTON, I.J.; HENSGENS, C.M.; SHIBATA, N.; SCHOFIELD, C.J.; HAJDU, J.; BALDWIN, J.E. Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. **Nature**. v. 387, p. 827-30, 1997.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; DIAZ-GUERRA, T.M.; MELLADO, E.; CANO, V.; TAPIA, C.; PERKINS, A.; GOMEZ-LOPEZ, A.; RODERO, L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 10, p. 4026-4034, 2005.

RUAN, S.Y.; CHIEN, J.Y.; HSUEH, P.R. Invasive *Trichosporonosis* caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, n. 1, p. 11–17, 2009.

SAMARANAYAKE, Y.H.; CHEUNG, B.P.K.; YAU, J.Y.Y.; YEUNG, S.K.W.; SAMARANAYAKE, L.P. Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial. **PLoS One**. v. 8, p. 1-12. 2013.

SANTANA, I.L.; GONÇALVES, L.M.; VASCONCELLOS, A.A.; SILVA, W.J., CURY, J.A.; DEL BEL CURY, A.A. Dietary carbohydrates modulate *Candida albicans* biofilm development on the denture surface. **PLoS One**. v.8, n.5, p. e64645, 2013.

SANTOS, A.L.S. HIV aspartyl protease inhibitors as promising compounds against *Candida albicans*. **World J. Biol. Chem.**, v. 1, n. 2, p. 21-30, 2010.

SANTOS, A.L.S.; BRAGA-SILVA, L.A. Aspartic Protease Inhibitors: Effective Drugs against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. **Mini-Rev. Med. Chem.**, v. 13, n. 1, p. 155-162, 2013.

SANTOS, C.O.; ZIJLSTRA, J.G.; PORTE, R.J.; KAMPINGA, G.A.; VAN DIEPENINGEN, a.d.; SINHA, b.; BATHOORN, E. Emerging pan-resistance in *Trichosporon* species: a case report **BMC Infect. Dis.** v.16, n. 148, 2016.

SANTOS, J.A.; AMARAL, M.C.O.; ARAÚJO, T.A.S.; FERNANDES, K.G.C.; CHAVES, A.C. isolation of a lipase-producing *Trichosporon* spp and enzyme extraction by two-phase aqueous system **Braz. J. Microbiol.** 38:62-64, 2007.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H.C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365-377, 2005.

SENEVIRATNE, C.J.; JIN, L.J.; SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Cell Density and Cell Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilm Antimicrob. Agents Chemother. v.52, n.9, p. 3259–3266, 2008.

SENER, L.; RIBAS, R.; VALENTE, P. Optimization of the cultivation conditions for the production of an antimicrobial compound by *Trichosporon japonicum* QU139. **Rev. Bras. Biocien.**, v. 9, n. 1, 2011.

SHIN, J. H.; KEE, S. J.; SHIN, M. G.; KIM, S. H.; SHIN, D. H.; LEE, S. K.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, p. 1244–1248, 2002.

SIDRIM, J.J.C.; PERDIGÃO-NETO, L.V.; CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.N.; LEITE, J.J.G.; TEIXEIRA, C.E.C.; MONTEIRO, A.J.; FREITAS, R.M.F.; RIBEIRO, J.F.; MESQUITA, J.L.R.; GONÇALVES, M.V.F.; ROCHA, M.F.G. Viral protease inhibitors

affect the production of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. **Can. J. Microbiol.**, v. 58, n. 7, p. 932-936, 2012.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, R.B.O.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MATSUMOTO, M.T.; BAEZA, L.C.; BENADUCCI, T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Genetic diversity and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated of intensive care units patients. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 585-592, 2008.

SILVESTRE JUNIOR, A.M.; MIRANDA, M.A.B.R.; CAMARGO, Z.P. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a brazilian population. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 628-634, 2010.

STEPANOVIC, S.; DJUKIC, N.; OPAVSKI, N.; DJUKIC, S. Significance of inoculum size in biofilm formation by staphylococci. **New Microbiol.** v.26, p.129–132. 2003.

SUGITA, T. *Trichosporon* behrend (1980). In: KURTZMAN C.P., FELL J.W., BOEKHOUT T. **The yeasts: a taxonomic study**. 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam. 2004.

SUGITA, T.; NAKAJIMA, M.; IKEDA, R.; MATSUSHIMA, T.; SHINODA, T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1826-1830, 2002.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, R.; SHINODA, T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 6, p. 1985-1993, 1999.

SUN, W.; SU, J.; XU, S.; YAN, D. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, n. 12, p. 1750-1757, 2012.

SUZUKI, K.; NAKASE, K.; KYO, T.; KOHARA, T.; SUGAWARA, Y.; SHIBAZAKI, T.; OKA, K.; TSUKADA, T.; KATAYAMA, N. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. **Eur. J. Haematol.**, v. 84, n. 5, p. 441–447, 2010.

TAFF, H.T.; MITCHELL, K.F.; EDWARD, J.A.; ANDES, D.R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance **Fut. Microbiol.** v.8, n.10, p.1325-1337, 2013.

TAJ-ALDEEN, S.J.; AL-ANSARI, N.E.L.; SHAFEI, S.; MEIS, J.F.; CURFS-BREUKER, I.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Molecular Identification and Susceptibility of *Trichosporon* Species Isolated from Clinical Specimens in Qatar: Isolation of *Trichosporon dohaense* Taj-Aldeen, Meis & Boekhout sp. nov. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 6, p. 1791–1799, 2009.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M.F.N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de catéteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TAVERNA, C.G.; CÓRDOBA, S.; MURISENGO, O.A.; VIVOT, W.; DAVEL, G.; BOSCO-BORGEAT, M.E. Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. **Med. Mycol.**, v. 52, n. 4, p. 356-366, 2014.

THOMPSON, G.R.; CADENA, J.; PATTERSON, T.F. Overview of Antifungal Agents. **Clin. Chest. Med.**, v. 30, n. 2, p. 203-215, 2009.

TAI, M.S.; YANG, Y.L.; WANG, A.H.; WANG, L.S.; LU, D.C.T.; LIOU, C.H.; HSIEH, L.Y.; WU, C.J.; CHENG, M.F.; SHI, Z.Y.; LO, H.J. Susceptibilities to Amphotericin B, Fluconazole and Voriconazole of *Trichosporon* Clinical Isolates. **Mycopathol.** v.174, n.2, p.121-130, 2012.

TSANG, C.S.P.; HONG, I. HIV protease inhibitors differentially inhibit adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces. **Mycoses**, v. 53, n. 6, p. 488-494, 2009.

UPPULURI, P.; CHATURVEDI, A. K.; SRINIVASAN, A.; BANERJEE, M.; RAMASUBRAMANIAM, A. K.; KOHLER, J. R.; KADOSH, D.; LOPEZ-RIBOT, J. L.

Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 3, p. 1-13, 2010.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, 2002.

VAZQUEZ, J. A. *Trichosporon* Infection. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 4, n. 1, p. 52–58, 2010.

VON ZEPELIN, M.B.; MEYER, I.; THOMSEN, R.; WU, R.; SANGLARD, D.; TELENTI, A.; MONOD, M. HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. **J. Invest. Dermatol.**, v.113, n. 5, p.747–751, 1999.

VORBECK, M.L.; CONE J.F. Characteristics of an intracellular proteinase system of a *Trichosporon* species isolated from Trappist-type cheese. **Appl. Microbiol.** v. 11, n. 1, p. 23-27, 1963.

WALSH, T.J.; GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E. ANAISSIE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, n.1, p.48–66, 2004.

WHITCHURCH, C.B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P.C.; MATTICK, J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Sci.** v. 295, p.1487, 2002.

WOLF, D.G.; FALK, R.; HACHAM, M.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G.; SHAPIRO, M.; BLOCK, C.; SALKIN, I.F.; POLACHECK, I. Multidrug-Resistant *Trichosporon asahii* Infection of Nongranulocytopenic Patients in Three Intensive Care Units. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, p. 4420–4425, 2001.

WU, J; XI, C. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. **Appl. Environm. Microbiol.** v. 75, p. 5390-5395, 2009.

YANG, R.Y., LI, H.T.; ZHU, H.; ZHOU, G.P.; WANG, M.; WANG, L. Genome sequence of the *Trichosporon asahii* environmental strain CBS 8904. **Eukar. Cell.** v.11, n.12, p.1586-7. 2012.

YANG, S.; LIAO, Y.; CONG, L.; LU, X.; YANG, R. *In vitro* interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157047, 2016.

ZARNOWSKI, R.; WESTLER, W.M.; LACMBOUH, G.A.; MARITA, J.M.; BOTHE, J.R.; BERNHARDT, J.; SAHROUI, A.L.H.; FONTAINE, J.; SANCHEZ, H.; HATFIELD, 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.

APÊNDICE A

Artigo publicado na Journal of Medical Microbiology, em novembro de 2015.

Journal of Medical Microbiology (2015), 64, 1277–1286

DOI 10.1099/jmm.0.000159

Trichosporon inkin biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals

Rossana de Aguiar Cordeiro,¹ Rosana Serpa,¹ Camila Flávia Uchoa Alexandre,¹ Francisca Jakelyne de Farias Marques,¹ Charline Vladia Silva de Melo,¹ Jonatas da Silva Franco,¹ Antonio José de Jesus Evangelista,¹ Zoilo Pires de Camargo,² Raimunda Samia Nogueira Brilhante,¹ Marcos Fabio Gadelha Rocha,^{1,3} José Luciano Bezerra Moreira,⁴ Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira^{1,5} and José Júlio Costa Sidrim¹

Correspondence

Rossana de Aguiar Cordeiro
rossanacordeiro@ufc.br

¹Medical Mycology Specialized Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

³Post Graduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Ceará, Brazil

⁴Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil

⁵Christus College, School of Medicine, Fortaleza, Ceará, Brazil

The aim of this study was to determine experimental conditions for *in vitro* biofilm formation of clinical isolates of *Trichosporon inkin*, an important opportunistic pathogen in immunocompromised patients. Biofilms were formed in microtitre plates in three different media (RPMI, Sabouraud and CLED), with inocula of 10^4 , 10^5 or 10^6 cells ml^{-1} , at pH 5.5 and 7.0, and at 35 and 28 °C, under static and shaking conditions for 72 h. Growth kinetics of biofilms were evaluated at 6, 24, 48 and 72 h. Biofilm milieu analysis were assessed by counting viable cells and quantification of nucleic acids released into biofilm supernatants. Biofilms were also analysed for proteolytic activity and antifungal resistance against amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole and voriconazole. Finally, ultrastructural characterization of biofilms formed in microtitre plates and catheter disks was performed by scanning electron microscopy. Greater biofilm formation was observed with a starter inoculum of 10^6 cells ml^{-1} , at pH 7.0 at 35 °C and 80 r.p.m., in both RPMI and Sabouraud media. Growth kinetics showed an increase in both viable cells and biomass with increasing incubation time, with maximum production at 48 h. Biofilms were able to disperse viable cells and nucleic acids into the supernatant throughout the developmental cycle. *T. inkin* biofilms produced more protease than planktonic cells and showed high tolerance to amphotericin B, caspofungin and azole derivatives. Mature biofilms were formed by different morphotypes, such as blastoconidia, arthroconidia and hyphae, in a strain-specific manner. The present article details the multicellular lifestyle of *T. inkin* and provides perspectives for further research.

Received 3 March 2015

Accepted 16 August 2015

INTRODUCTION

In recent decades, the frequency of fungal infections has increased among immunocompromised patients (Pfaller & Diekema, 2007). Although *Candida* spp. are the most important pathogens in such patients, *Trichosporon*

Abbreviations: AMB, amphotericin B; CAS, caspofungin; FLU, fluconazole; IFI, invasive fungal infection; ITR, itraconazole; MBIC, minimum biofilm inhibitory concentration; SEM, scanning electron microscopy; VOR, voriconazole.

spp. have been considered a common cause of fungaemia in patients with malignant haematological disease (Girmenia *et al.*, 2005). Despite the fact that trichosporonosis is usually considered a benign superficial infection, invasive fungal infections caused by *Trichosporon* spp. are important diseases, with attributable death rates of up to 80 % in high-risk groups (Colombo *et al.*, 2011).

Trichosporon spp. are easily recovered from soil and fresh water (Chagas-Neto *et al.*, 2008; Vazquez, 2010), and are considered a member of the human microbiota of the

APÊNDICE B

Artigo que será submetido para a International Journal of Medical Microbiology, em julho de 2016.

HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic cells and biofilms of *Trichosporon* spp.

¹Rossana de Aguiar Cordeiro *,¹Rosana Serpa, ¹Patrícia Bruna Leite Mendes, ¹Antonio José de Jesus Evangelista, ¹Ana Raquel Colares Andrade, ¹Jônatas da Silva Franco, ¹Vandbergue dos Santos Pereira, ¹Lucas Pereira de Alencar, ¹Jonathas Sales de Oliveira ²Zoilo Pires de Camargo, ³Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, ¹Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco, ¹Raimunda Samia Nogueira Brilhante, ^{1,4}Marcos Fabio Gadelha Rocha, ¹José Júlio Costa Sidrim.

¹ Medical Mycology Specialized Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

² Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

³ Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco.

⁴ Post Graduate Program in Veterinary Sciences, College of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Corresponding author: Federal University of Ceará, Campus do Porangabussu, Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, CEP: 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brasil. Tel: +55 85 33668594. E-mail: rossanacordeiro@ufc.br

ANEXOS

1. MEIOS DE CULTURA

Ágar Batata

Ágar Batata – 13 gr

Água destilada q.s.p. - 1000 mL

Esterilização por autoclavação, a 121°C por 15 minutos.

Caldo Sabouraud dextrose

Glicose - 20,0 g

Peptona - 10,0 g

Extrato de levedura - 5,0 g

Água destilada q.s.p. - 1000 mL

Esterilização por autoclavação, a 121°C por 15 minutos.

Meio RPMI 1640

RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio - 10,4 g

Água destilada - q.s.p 1000 ml

Adicionar lentamente o pó sob agitação em água destilada e ajustar o pH final para 7,0 utilizando-se solução de MOPS com concentração final de 0,165 mol/L. Completar o volume com água destilada e esterilizar por filtração.

Caldo CLED

Digestão Péptica de Tecido Animal - 4.0 gr

Caseína Enzimática hidrolisada - 4.0 gr

Extrato de Bife (Carne bovina) - 3.0 gr

Lactose - 10.0 gr

L-Cistina - 0.128 gr

Azul de Bromotimol - 0.02 gr

pH Final (a 25°C): 7.3 ± 0.2

Esterilização por autoclavação, a 121°C por 15 minutos.

Ágar Ureia de Christensen's (sólida)

Ágar base ureia (Christensen's) - 29 g

Ágar bacteriológico - 15 g

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Suspender o ágar base ureia em 100 mL da água destilada, misturar até dissolver completamente. Esterilizar por filtração. Distribuir, alíquotas de 10 mL, e manter, sob refrigeração, até o momento do uso. Dissolver o ágar bacteriológico em água destilada. Distribuir, alíquotas de 90 mL, e esterilizar em autoclave, a 121 °C, por 15 min. Para preparar 100 mL de meio, é necessário fundir 90 mL da solução de ágar, esperar esfriar até que esta atinja aproximadamente 50°C e adicionar 10 mL da solução de uréia. Homogeneizar bem a mistura e distribuir alíquotas de 1 mL, em tubos de ensaio estéreis. Deixar solidificar na posição inclinada.

2. SOLUÇÕES

Lactofenol azul-algodão

Ácido láctico - 20 g

Fenol - 20 g

Glicerina - 20 g

Azul-algodão - 0,05 g

Água deionizada 20 mL

Solução Salina (0,9%)

Cloreto de sódio - NaCl - 0,9 g

Água deionizada 100 mL

MOPS (ácido 2-[N-morfolino] propanosulfônico)

MOPS em pó - 6,9 g

Dissolver o MOPS em 200 mL de água destilada autoclavada e armazenar na geladeira em garrafa envolvida com papel alumínio.

Tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) acrescido de 0,05% de Tween 20

- Cloreto de Sódio (NaCl) – 8 g

- Cloreto de Potássio (KCl) – 0,2 g

- Fosfato de Sódio Dibásico (Na₂HPO₄) – 1,44 g

- Fosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄) – 0,24 g

- Tween 20 – 500 µL

- Água duplamente destilada – QSP 1000 mL

Dissolver todos os sais em 800 mL de H₂O destilada. Ajustar o pH para 7,4 e então acrescentar os 500 µL de Tween 20, completar para 1000 mL.

Solução de Cristal Violeta 0,3%

Cristal Violeta em pó – 0,3 g

Álcool etílico 95% - 20 mL

Oxalato de amônio 0,8 g

Água destilada 80 mL

Dissolver o cristal violeta em álcool etílico, e misturar os outros componentes. Esterilizar por autoclavagem a 121°C por 15 min.

Solução de Ácido Acético 33%

Água destilada - 67 mL

Ácido acético P.A. - 33 mL

Adicionar 33 mL de ácido acético em 67 mL de água deionizada.