



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

LÍVIA MARIA GALDINO PEREIRA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DA MOLÉCULA DE QUORUM SENSING FARNESOL
FRENTE À CEPAS DE *Trichosporon asahii* E *T. inkin***

FORTALEZA-CE

2018

LÍVIA MARIA GALDINO PEREIRA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DA MOLÉCULA DE QUORUM SENSING FARNESOL
FRENTE À CEPAS DE *Trichosporon asahii* E *T. inkin***

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

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

FORTALEZA - CE

2018

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)

P492a Pereira, Livia Maria Galdino.
ATIVIDADE INIBITÓRIA DA MOLÉCULA DE QUORUM SENSING FARNESOL FRENTE À CEPAS
DE *Trichosporon asahii* E *T. inkin* / Livia Maria Galdino Pereira. – 2018.
72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Rossana de Aguiar Cordeiro.

1. Farnesol. 2. *Trichosporon*. 3. Filamentação. 4. Biofilme. I. Título.

CDD 616.9

LÍVIA MARIA GALDINO PEREIRA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DA MOLÉCULA DE QUORUM SENSING FARNESOL
FRENTE À CEPAS DE *Trichosporon asahii* E *T. inkin***

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

Aprovada em: 15/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Manoel Paiva de Araújo Neto
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Aos meus pais, Maria Socorro Barbosa e Joaquim Galdino,
por todo o incentivo e apoio para minha formação acadêmica e pessoal.

Às Professoras Germana Paixão e Lydia Pantoja, por terem me
apresentado com tanta maestria a esse mundo particular da Microbiologia.

Aos Professores do PPGMM, em especial, os do CEMM,
por sempre incentivarem à busca da melhor qualificação.

AGRADECIMENTOS

Algumas vezes me peguei pensando em como eu iria fazer os agradecimentos da minha dissertação, não por não gostar de agradecer, mas por ser difícil, em poucas palavras, expressar a minha gratidão por todas as pessoas que participaram da minha caminhada até aqui.

Agradeço a Deus por ser o meu protetor diário, Aquele que divide comigo diariamente as alegrias e angústias, Aquele que me surpreende por cada anjo que coloca em minha vida para que o caminho seja mais leve e sereno.

Agradeço aos meus pais que insistiram um pouco mais, depois de 3 filhos homens, para viesse uma menina, menina essa que recebeu muito amor e apoio para que conquistasse cada vitória, a esse amor eu sou eternamente grata.

Aos meus amados irmãos, que foram os primeiros a me ensinar que a vida precisa ser compartilhada, que é melhor lutar juntos do que sozinho, que a união e o respeito nos fortalece. A vocês sou eternamente grata, essa conquista é nossa.

Agradeço a meu amado Samuel que, por muitas vezes, segurou minha mão me dando força necessária para mais um dia. Assim como aos meus sogros Demontiei e Arlete, por serem os meus exemplos de determinação e amor, com o incentivo de vocês a caminhada vencida.

Agradeço com amor e carinhos às Professoras Germana Paixão e Lydia Pantoja por me acolherem como filha científica e ter me apresentado o mundo da microbiologia com tanta maestria.

Ao meu amigo Bruno Jaegger por ter aprimorado o meu encanto pela microbiologia e ter me conduzido ao Programa de Microbiologia Médica, além de ser um porto seguro para os assuntos diários.

Agradeço com todo carinho e respeito a minha orientadora Prof^a Rossana Cordeiro por ter me guiado não somente nas pesquisas científicas como também na dança difícil da vida, sendo fundamental na minha formação profissional e pessoal.

Aos demais professores que compõem o programa de pós-graduação em microbiologia médica, em especial aos do laboratório do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), por dispões dos melhores conteúdos para preparo dos seus alunos.

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa dessa dissertação, contribuindo significativamente com suas sugestões para o engrandecimento desse trabalho, meu muito obrigada.

Aos meus companheiros de laboratório que fazem o convívio laboral mais leve e divertido, além de compartilhar os incessantes dias de experimentos e disciplinas. Agradeço em especial a Rosana Serpa que, mesmo de longe, atendia com maestria as minhas dúvidas e orientações. À Jamille Alencar que encarou essa batalha como se fosse sua, sem você esse trabalho não teria o mesmo êxito. Aos amigos Kleybson Sousa, Fernando Portela, Raquel Collares, Patrícia Leite por compartilharem todos os dias as angústias e felicidades por estar dando certo, sorrir com vocês me deu força para continuar.

Aos funcionários dessa instituição, em especial os técnicos de laboratório Terezinha de Jesus e Gláucia Guedes, e a secretária Carolinda Soares por sempre estarem dispostos a ajudar para que desse tudo certo.

A CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

A todos meu muito obrigado!

“Sonhos determinam o que você quer.

Ação determina o que você conquista”

Aldo Novak

RESUMO

O gênero *Trichosporon* corresponde aos fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, normalmente associado a infecções superficiais como *pedra branca*. Nos últimos anos, esse gênero vem se destacando como importantes patógenos em infecções sistêmicas, principalmente em pacientes com desequilíbrio imunológico. Infecções por *Trichosporon* spp. são geralmente associadas à formação de biofilmes em dispositivos médicos invasivos. Os biofilmes são comunidades de células microbianas envoltas por uma matriz exopolimérica que apresentam produção aumentada dos fatores de virulência, além do fenótipo de tolerância aumentada aos antifúngicos. O presente estudo avaliou o efeito inibitório do farnesol, em crescimento planctônico e em biofilme de *T. asahii* (n=3) e *T. inkin* (n=7). Também foi analisada a ação do farnesol na produção de proteinases em crescimento planctônico e em biofilme, além da conversão morfológica de blastoconídio para hifas. O ensaio de sensibilidade das células planctônicas foi realizado pelo método de microdiluição em caldo em meio RPMI de *T. asahii* (n=3) e *T. inkin* (n=7) nas concentrações de farnesol variando entre 2,33 e 1196,1 μM . O farnesol foi testado como inibidor de biofilme nas concentrações entre 37,37 e 1196,1 μM nos momentos de adesão, maturação e biofilme maduro. Para tanto, os biofilmes de *T. asahii* (n=3) e *T. inkin* (n=7) foram formados em meio RPMI com inóculo de 10^6 células/mL e incubados a 35 °C sob agitação a 80 rpm e posteriormente analisados quanto a biomassa, atividade metabólica e ultraestrutura por microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de varredura. A inibição de filamentação foi analisada por meio de microcultivo em ágar malte contendo concentrações do composto de 598 μM e 1196,1 μM . Observamos que o farnesol inibiu o crescimento planctônico em 80% na concentração de 598 μM frente a *T. asahii* e para *T. inkin* reduziu em 80% no intervalo de 74,75 a 598 μM . A adesão celular foi reduzida em cerca de 80% na concentração de 299 μM para *T. asahii* e 598 μM para *T. inkin* e no desenvolvimento do biofilme na concentração de 149,5 μM para ambas as cepas, alterando sua estrutura. Já o farnesol em contato com o biofilme maduro reduziu em 50% o biofilme de *T. asahii* na concentração de 598 μM e de *T. inkin* na concentração de 299 μM . Farnesol inibiu filamentação gradativa nas concentrações de 598 e 1196,1 μM , sendo observado a predominância de blastoconídios. Na análise do biofilme por microscopia eletrônica de varredura observamos que o farnesol foi capaz de inibir a adesão celular e o desenvolvimento das hifas, assim como interferiu negativamente na maturação do biofilme, modificando a morfologias das hifas. O farnesol em contato com o biofilme maduro desestruturou a robustez do biofilme, destruindo a matriz extracelular. Desse modo, destaca-se a necessidade de investigar os mecanismos que o composto farnesol age sobre as células de *Trichosporon* spp. e o seu potencial uso como alternativa para profilaxia de tricosporonose.

Palavras-chave: Farnesol, *Trichosporon*, Filamentação, Biofilme.

ABSTRACT

The genus *Trichosporon* corresponds to the fungi belonging to phylum Basidiomycota, usually associated to superficial infections like *piedra branca*. In recent years, this genus has been highlighted as important pathogens in systemic infections, especially in patients with immunological imbalance. Infections with *Trichosporon* spp. are generally associated with biofilms formation in invasive medical devices. Biofilms are communities of microbial cells surrounded by an exopolymeric matrix that exhibit increased virulence factor production, in addition to the increased tolerance phenotype to antifungals. The present study evaluated the inhibitory effect of farnesol, a molecule belonging to *Candida albicans* quorum sensing system, in planktonic growth and biofilm of *T. asahii* (n = 3) and *T. inkin* (n = 7). The action of farnesol in planktonic and biofilm growth protease production was also analyzed, as well as the morphological conversion of blastoconide to hyphae. The plankton cell sensitivity assay was performed by the broth microdilution method in RPMI medium of *T. asahii* (n = 3) and *T. inkin* (n = 7) at farnesol concentrations ranging from 2.33 to 1196.1 μM . Farnesol was tested as a biofilm inhibitor at concentrations between 37.37 and 1196.1 μM in adhesion, maturation and mature biofilm times. The biofilms of *T. asahii* (n = 3) and *T. inkin* (n = 7) were formed in RPMI medium with inoculum of 10^6 cells / mL and incubated at 35 °C under shaking at 80 rpm and then analyzed for biomass, metabolic activity and ultrastructure by laser confocal microscopy and scanning electron microscopy. Filamentation inhibition was analyzed by microculture on malt agar containing compound concentrations of 598 μM and 1196.1 μM . It was observed that farnesol inhibited planktonic growth by 80% at the concentration of 598 μM concentration against *T. asahii* and for *T. inkin* reduced by 80% in the range of 74.75 to 598 μM for *T. inkin* and in the development of the biofilm at the concentration of 149.5 μM for both strains, altering its structure. The farnesol in contact with the mature biofilm reduced *T. asahii* biofilm at 568.1 μM and of *T. inkin* at 299 μM concentrations by 50%. Farnesol inhibited gradual filamentation at 598 and 1196.1 μM concentrations, with blastoconidia predominance. The scanning electron microscopy in biofilm analysis were observed that farnesol was able to inhibit cell adhesion and hyphae development, as well as interfered negatively in the biofilm maturation, modifying the hyphae morphologies. The contact between farnesol and mature biofilm disorganized biofilm robustness, destroying the extracellular matrix and water channels. Thus, it is necessary to investigate the mechanisms of farnesol compound acts on the *Trichosporon* spp. cells and its potential use as an alternative for tricosporonosis prophylaxis.

Keywords: Farnesol, *Trichosporon*, filamentation, Biofilm

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Morfologia das colônias de (A) *T. inkin* e (B) *T. asahii* em cultivo em ágar Sabouraud dextrose, revelando colônias com colaração creme e branca, além de relevo cerebriforme. (C) a seta mostra um blastoconídios; (D) Arthroconídios em hifas verdadeiras; (E) Pseudo-hifa e (F) prova da urease mostrando reação positiva (cor rosa) e reação negativa (cor amarela)..... 19
- Figura 2** *Piedra* branca acometendo cabelo (A); Microscopia de uma infecção do pelo, mostrando nódulo externo ao pelo; (C) Onicomicose causada por *Trichosporon spp.*, com onicodistrofia da lâmina ungueal e paroníquia..... 20
- Figura 3** Estágios de desenvolvimento dos biofilmes: 1. adesão reversível com a formação de microcolônias; 2. adesão irreversível com produção de matriz exopolissacarídica (EPS), e começo da comunicação entre as células; 3. biofilme maduro com estrutura típica de cogumelo permeados por canais de água e 4. a dispersão de células do biofilme maduro..... 26
- Figura 4** Fórmula estrutural da molécula farnesol..... 29
- Figura 5** Efeito do farnesol na filamentação de *T. asahii* e *T. inkin* feito por microcultivo. 1 e 2 são os controles de crescimento sem adição do composto; 3 e 4 representam crescimento fúngico com interferência do composto farnesol a 598 μM e 5 e 6 representam o crescimento fúngico com interferência do composto a 1196,1 μM . Na seta (a) estrutura filamentosa, hifas arthroconidiadas hialinas e seta (b) estrutura de blastoconídio. Aumento de 400x..... 46
- Figura 6** Inibição da adesão celular das células de *T. asahii* (n=3) (A) e *T. inkin* (n=7) (B) na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 37,37 a 1196,1 μM avaliada pelo ensaio de redução de XTT a 492 nm. Controles sem farnesol (barras pretas). Os asteriscos representam de onde começam as diferenças estatísticas em comparação ao controle sem tratamento ($p>0,05$)..... 47
- Figura 7** Inibição do desenvolvimento de biofilmes de cepas de *T. asahii* (n=3) e *T. inkin* (n=7) na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 37,37 a 1196,1 μM após o momento de adesão celular e controles sem

	farnesol (barras pretas). (A e C) Atividade metabólica pelo ensaio de redução de XTT de cepas de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> , respectivamente. (B e D) Biomassa por coloração com cristal violeta de cepas de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> . Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle ($p>0,05$).....	48
Figura 8	Redução de biofilmes de cepas de <i>T. asahii</i> (n=3) e <i>T. inkin</i> (n=7) na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 37,37 a 1196,1 μ M após o biofilme já maduro e controles sem farnesol (barras pretas). (A e C) Atividade metabólica pelo ensaio de redução de XTT de cepas de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> , respectivamente. (B e D) Biomassa por coloração com cristal violeta de cepas de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> . Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle ($p>0,05$).....	49
Figura 9	Redução da produção de protease em crescimento planctônico (A) <i>T. asahii</i> (n=3) e (B) <i>T. inkin</i> (n=7) na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 18,68 e 37,37 μ M.....	50
Figura 10	Quantificação da produção de protease em biofilme (A) <i>T. asahii</i> (n=3) e (B) <i>T. inkin</i> (n=7) após 24h de crescimento na presença de farnesol (barras brancas) nas concentrações de 18,68 e 37,37 μ M.....	51
Figura 11	Quantificação da produção de protease em biofilme (A) <i>T. asahii</i> (n=3) e (B) <i>T. inkin</i> (n=7), no qual não sofreu alteração após 48h de crescimento na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 18,68 e 37,37 μ M..	51
Figura 12	Microscopia eletrônica de varredura da Morfologia e ultraestrutura de biofilmes de <i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072 após o tratamento com farnesol na concentração de 598 μ M durante a adesão celular (B), desenvolvimento do biofilme (D) e biofilme maduro (F), comparado com os respectivos controles de cada tratamento (A, C e E). Magnitude: 1000x. Barra: 100 μ m.....	53
Figura 13	Microscopia eletrônica de varredura da Morfologia e ultraestrutura de biofilmes de <i>T. inkin</i> CEMM 05-6-074 após o tratamento com farnesol na concentração de 598 μ M durante a adesão celular (B), desenvolvimento do biofilme (D) e biofilme maduro (F), comparado com os respectivos controles	

	de cada tratamento (A, C e E). As setas vermelhas indicam os canais de passagem de água. Magnitude: 1000x. Barra: 100µm.....	54
Figura 14	Microscopia confocal de varredura a laser e ultraestrutura de biofilmes de <i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072 após o tratamento com farnesol na concentração de 598 µM durante a adesão celular (B), desenvolvimento do biofilme (D) e biofilme maduro (F), comparado com os respectivos controles de cada tratamento (A, C e E). Magnitude: 1000x. Barra: 100µm.....	56
Figura 15	Microscopia confocal de varredura a laser e ultraestrutura de biofilmes de <i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072 após o tratamento com farnesol na concentração de 598 µM durante a adesão celular (B), desenvolvimento do biofilme (D) e biofilme maduro (F), comparado com os respectivos controles de cada tratamento (A, C e E). Magnitude: 1000x. Barra: 100µm.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação e origem de isolamento das cepas de <i>Trichosporon</i> utilizadas neste estudo.....	33
Tabela 2	Sensibilidade antimicrobiana de cepas de <i>Trichosporon asahii</i> e <i>T. inkin</i> frente ao composto farnesol.....	43
Tabela 3	Interação do farnesol com anfotericina B e fluconazol para <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Gênero <i>Trichosporon</i> : características gerais e identificação laboratorial	17
2.2 Infecções causadas pelo gênero <i>Trichosporon</i>	19
2.3 Fatores de virulência de <i>Trichosporon</i> spp.	22
2.4 Biofilmes	24
2.5 Sensibilidade a antifúngicos	27
2.6 Molécula de Farnesol.....	29
3 HIPÓTESES	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo geral	32
4.2 Objetivos específicos	32
5 METODOLOGIA.....	33
5.1 Locais de estudo	33
5.2 Microrganismos	33
5.3 Drogas.....	34
5.4 Teste de sensibilidade <i>in vitro</i>	34
5.5 Interação entre farnesol e antifúngicos	35
5.6 Efeito do farnesol na filamentação de <i>Trichosporon</i> spp.	36
5.7 Células associadas em biofilme de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	36
5.7.1 Efeito do farnesol sobre a adesão celular	36
5.7.2 Efeito do farnesol no desenvolvimento do biofilme	37
5.7.3 Efeito do farnesol frente ao biofilme maduro	37
5.7.4 Efeito do farnesol na produção de proteases	38
5.7.5 Métodos quantitativos para análise dos biofilmes	38
5.7.6 Morfologia e estrutura dos biofilmes	39
5.8 Análise estatística	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Efeito do farnesol sobre o crescimento planctônico de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	42
6.2 Interação entre drogas.....	44
6.3 Efeito do farnesol na micromorfologia de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	44
6.4 Efeito do farnesol sobre biofilme de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	47
6.4.1 Efeito do farnesol sobre a adesão celular	47

<i>6.4.2 Efeito do farnesol na formação do biofilme</i>	47
<i>6.4.3 Efeito do farnesol no biofilme maduro</i>	49
<i>6.4.4 Atividade proteolítica em crescimento planctônico e em biofilme</i>	50
<i>6.4.5 Morfologia e estrutura dos biofilmes</i>	52
<i>6.4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura</i>	52
<i>6.4.5.2 Microscopia confocal a laser</i>	55
7 DISCUSSÃO	58
8 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A frequência de infecções fúngicas oportunistas causadas por leveduras tem aumentado nas últimas décadas, contribuindo para o aumento dos índices de morbimortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Além de *Candida* spp., dados epidemiológicos mundiais têm apontado *Trichosporon* spp. como importantes patógenos oportunistas nesses pacientes. Apesar de serem comumente descritas como agentes causadores de infecções cutâneas de fácil tratamento, nos últimos anos, as espécies deste gênero têm sido associadas à infecções sistêmicas, pneumonias e endocardites, principalmente, em pacientes com câncer.

O gênero *Trichosporon* é formado por basidiomicetos leveduriformes que podem ser encontrados na água, solo e na microbiota do trato gastrointestinal, pele e trato respiratório superior de humanos. Além disso, *T. asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. ovoides* têm sido associados à infecções superficiais e sistêmicas, sendo *T. asahii* a principal causa de tricosporonose disseminada.

Espécies do gênero *Trichosporon* apresentam grande capacidade de formação de biofilmes em dispositivos invasivos, além de produção de exoenzimas, glucuroxilomanana e melanina. Estas características estão associadas a maior virulência das cepas, de modo que, células associadas em biofilme produzem mais proteases que as células planctônicas, além do fenótipo de tolerância aumentada aos antifúngicos. Também é percebido que as espécies de *Trichosporon* capazes de formar biofilmes apresentam uma ampla variedade de estruturas morfológicas, como blastoconídios, artroconídios e produção de hifas no interior dessa conformação celular.

A resistência aos antifúngicos e a produção de proteases são características presentes nos biofilmes de *Trichosporon* e, desta forma, estratégias empregadas para a inibição do crescimento fúngico devem ser capazes também de controlar a produção de fatores de virulência.

Diante disso, há a necessidade de buscar novos compostos que possuam atividade antifúngica. O farnesol, um álcool sesquiterpeno, que foi descrito pela primeira vez por Hornby como uma molécula participante do *quorum sensing* de *Candida albicans*, tem sido estudada pelo seu potencial agente microbiano. Ainda não se sabe o mecanismo de ação dessa molécula, mas alguns estudos indicam que farnesol atua na membrana celular.

Assim, esse trabalho tem por objetivo investigar o efeito inibitório do farnesol no crescimento planctônico e em biofilme frente a cepas de *Trichosporon asahii* e *Trichosporon inkin*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Trichosporon*: características gerais e identificação laboratorial

Em 1865 foi feita a primeira descrição de uma espécie de *Trichosporon* por Beigel, que observou este microrganismo causando nódulos em cabelos de uma peruca, chamando-o de *Sclerotium beigelii* (SIDRIM; ROCHA, 2004; VAZQUEZ, 2010). Em 1902, Vuillemin propôs a denominação de *Trichosporon beigelii*, uma levedura que contém artrósporos, ao observar um quadro clínico de *pieira* branca semelhante àquele descrito por Beigel (SIDRIM, ROCHA, 2004). A denominação *Trichosporon* é uma derivação do grego, onde “trichos” significa cabelo e “sporon” representa esporos. Esta nomenclatura está relacionada à presença de nódulos claros e irregulares ao longo do cabelo, comum nos quadros de *pieira* branca (COLOMBO et al., 2011).

Por muitos anos, o gênero *Trichosporon* correspondia a uma coleção de leveduras morfofisiologicamente similares incluídas sob o nome de *T. beigelii*. Posteriormente, com o advento das técnicas moleculares, esses organismos se mostraram distintos geneticamente, sendo, portanto, reorganizados em outras espécies. Atualmente, o gênero é subdividido em 5 clados: *cutaneum*, *ovoides*, *brassicae*, *gracile* e *porosum*, compreendendo 51 espécies de *Trichosporon* aceitas, sendo 16 clinicamente relevantes (COLOMBO et al., 2011; TAVERNA, 2014; MARINÉ et al., 2015).

O gênero *Trichosporon* compreende fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, predominantemente leveduriformes, amplamente distribuídos na natureza, normalmente, em áreas temperadas e tropicais. Podem ser encontrados no solo, água, madeiras em decomposição, em humanos e outros animais (CHAGAS-NETO et al., 2008; VAZQUEZ, 2010; MARINÉ et al., 2015). Em humanos, podem fazer parte da microbiota permanente do trato gastrointestinal, além de serem componentes da microbiota transitória do trato respiratório superior e da pele (COLOMBO et al., 2011; TAVERNA et al., 2014; KHAN, et al., 2015).

Espécies do gênero *Trichosporon*, em meio Sabouraud dextrose, formam culturas com colônias leveduriformes com matiz de coloração que variam de brancas a bege, textura cremosas a secas e com aspecto característico com sulcos cerebriformes radiados (Figuras 1A

e 1B) (VAZQUEZ, 2010; COLOMBO et al, 2011; BENTUBO et al, 2013; MONTOYA et al., 2015).

Na análise microscópica, na fase assexuada, os fungos gênero *Trichosporon* se caracterizam pela presença de blastoconídios e artroconídios (Figuras 1C e 1D), que são estruturas assexuadas que se desprendem das hifas verdadeiras, além de pseudo-hifas (Figura 1E) e hifas hialinas, com fase sexuada desconhecida. Entretanto, outras espécies possuem estruturas que as diferem morfológicamente, como apressório, macroconídio ou conidiação meristemática (GUÉHO et al., 1994; SUGITA, 2004; CHAGAS-NETO et al., 2008; BENTUBO et al., 2013).

Na identificação por métodos bioquímicos e fisiológicos, todas as espécies de *Trichosporon* são capazes de assimilar diferentes carboidratos, não assimila o nitrato e decompõe a arbutina, além de degradar ureia (Figura 1F), porém, não realizam fermentação (ARAUJO; MARQUES, 2010; CHAGAS-NETO et al., 2008; VAZQUEZ, 2010; COLOMBO et al, 2011; MONTOYA et al., 2014; MONTOYA et al., 2015). Algumas espécies do referido gênero apresentam tolerância a cicloheximida, crescendo em meios de cultivo com concentração de 0,1% do composto (MONTOYA et al., 2015).

A taxonomia de *Trichosporon* spp. baseada nas técnicas de identificação fenotípica, por meio das características macro e micromorfológicas, fisiologia e ecologia gera resultados inconsistentes e muita controvérsia devido as semelhanças entre as espécies. Como o perfil de sensibilidade pode variar de acordo com as espécies, a identificação de *Trichosporon* spp. é de fundamental importância para ajudar nos parâmetros epidemiológicos e definir a associação clínica com o tratamento a antifúngicos (COLOMBO et al., 2011; TAVERNA et al., 2014). Assim, para a identificação precisa, sugerem-se técnicas moleculares para análise das regiões intergênica do DNA ribossômico e da sequência 26S do DNA ribossômico, além da quantificação de guanina-citosina (mol% G-C). Os genes ribossomais são alvos de regiões de conservação evolutiva, cujas regiões pesquisadas são as IGS (*Intergenic Spaces*) e ITS (*Internal Transcriber Spaces*) das subunidades 26S e 5S do RNA ribossomal (CHAGAS-NETO et al., 2008; COLOMBO et al, 2011; MONTOYA et al., 2015). Recentemente, foi mostrada a utilidade da técnica de espectrometria de massa para análise de perfis proteicos por MALDI-TOF, a qual foi capaz de identificar até 16 espécies de relevância clínica. (TAVERNA et al., 2014).

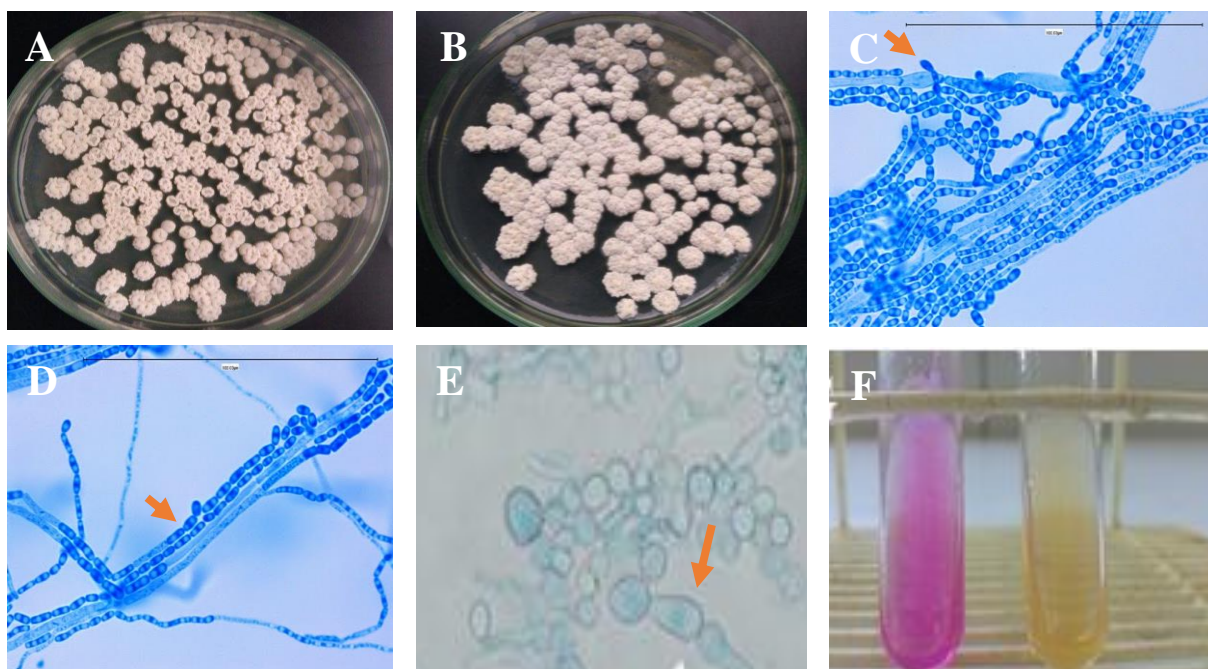


Figura 1: Aspectos macro e micromorfológicos de *Trichosporon* spp.. Morfologia das colônias de *T. inkin* (A) e *T. asahii* (B) em cultivo em ágar Sabouraud dextrose, revelando colônias com coloração creme e branca, além de relevo cerebriforme. (C) a seta mostra um blastoconídios; (D) Arthroconídios em hifas verdadeiras; (E) Pseudo-hifa e (F) prova da urease mostrando reação positiva (cor rosa) e reação negativa (cor amarela). Fonte: Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM/UFC (2017).

A identificação precisa desses fungos é muito significativo no cenário clínico para melhorar o tratamento com antifúngico, pois dados da literatura mostram resistência de *T. asahii* a anfotericina B (AMB) – droga considerada padrão-ouro no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas (MONTROYA et al., 2015). Além disso, as outras espécies de relevância clínica parecem ser menos sensíveis *in vitro* a agentes triazólicos em comparação a AMB (TAVERNA et al., 2014).

2.2 Infecções causadas pelo gênero *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* corresponde a fungos que fazem parte da microbiota humana, porém, devido a alterações do estado imunológico do paciente, esses fungos podem causar infecções oportunistas. Contudo, os primeiros relatos de *Trichosporon* spp. como agentes

primários de infecções humanas foram atribuídas a infecções superficiais, como a *pedra* branca e a onicomicose (COLOMBO et al., 2011; MONTOYA et al., 2014; ESCARRÁ et al., 2017). *Piedra* branca é uma infecção fúngica crônica da cutícula dos pelos das axilas, barba, bigode, áreas genitais e couro cabeludo (Figura 2 A), caracterizada pela presença de nódulos friáveis de coloração branca a amarela (Figura 2 B). A doença não mostra predileção por grupos étnicos, sexo e idade, mas tem relação com as condições higiênico-sanitárias dos pacientes (SIDRIM; ROCHA, 2004; DINIZ; FILHO DE SOUZA, 2005; ARAÚJO; MARQUES, 2010). Já onicomicose, infecção que acomete a unha, muitas vezes, pode estar associada aos fungos dermatófitos. Contudo, dependendo da área geográfica, *Trichosporon* spp. pode ser o agente etiológico responsável por até 40% destas infecções, nas quais a espécie mais isolada é *T. cutaneum* (CHAGAS-NETO et al., 2008; COLOMBO et al., 2011; MARINÉ et al., 2015).



Figura 2: Infecções superficiais causadas por *Trichosporon*. *Piedra* branca acometendo cabelo (A); Microscopia de uma infecção do pelo, mostrando nódulo externo ao pelo; (C) Onicomicose causada por *Trichosporon* spp., com onicodistrofia da lâmina ungueal e paroníquia. Fonte: Marques & Camargo, 2012.

Entretanto, nos últimos anos, é crescente o isolamento de *Trichosporon* spp. em infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, sendo considerado um sério problema para a saúde pública devido às altas taxas de mortalidade dos pacientes acometidos na América do Norte, Europa, Ásia e América do Sul (BENTUBO et al., 2014; TAVERNA et al., 2014; ESCARRÁ et al., 2017). As espécies do gênero *Trichosporon* representam 10,7% das espécies não *Candida* em infecções invasivas, acarretando índices de mortalidade de 87,5% em pacientes adultos no Brasil (MARINÉ et al., 2015).

Tricosporonose é uma doença fúngica do tipo invasiva, sistêmica, que acomete, principalmente, pacientes imunocomprometidos, com doenças hematológicas malignas,

transplantados, principalmente de medula óssea, pacientes em uso prolongado de corticosteroides, indivíduos que realizaram cirurgia de válvulas cardíacas e pacientes infectados pelo vírus HIV (DINIZ; FILHO DE SOUZA, 2005; DE CARVALHO et al., 2008; ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; ESCARRÁ et al., 2017).

Existem duas apresentações clínicas de tricosporonose, a localizada e a disseminada. A primeira forma se caracteriza por acometer apenas um único órgão ou sistema, como válvulas cardíacas. Já a segunda forma se caracteriza por acometer vários órgãos com disseminação hematogênica, como infecções do sistema nervoso central (COX; PERFECT, 1999).

Infecções hospitalares invasivas causadas por *Trichosporon* spp. são geralmente associadas a uso de cateteres venosos centrais, cateteres vesicais e dispositivos médicos de uso prolongado, pois facilita a adesão das células fúngicas para formar biofilmes, onde a espécie mais frequentemente isolada é *T. asahii* (ARAÚJO; MARQUES, 2010; VAZQUEZ, 2010; COLOMBO et al., 2011; MARINÉ et al., 2015). Dados epidemiológicos mostram que *T. inkin* é a segunda espécie mais comumente associada a tricosporonose invasiva, isolada de amostras clínicas como urina, sangue e cateteres (ARAÚJO; MARQUES, 2010; SILVESTRE et al., 2010; ALMEIDA JÚNIOR & HENNEQUIN, 2016). Contudo, outras espécies têm sido relatadas causando infecções invasivas, como *T. mucoides*, *T. asteroides* e *T. ovoides* (ARAÚJO; MARQUES, 2010; TAVERNA et al., 2014).

As infecções superficiais, normalmente, respondem bem aos tratamentos com azólicos como: fluconazol, itraconazol e voriconazol. Entretanto, as infecções invasivas representam um desafio, pois não há padronização terapêutica. Vários estudos relatam que o tratamento das infecções por *T. asahii* tem pouco sucesso com a administração de anfotericina B e caspofungina (VAZQUEZ, 2010; MARINÉ et al., 2015; CONG et al., 2016).

Os novos antifúngicos azólicos, como o voriconazol, mostraram ótima eficiência para o tratamento de tricosporonose invasiva. Uma vez que apresentam boa atividade tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra espécies de *Trichosporon*. Contudo, o alto custo desses medicamentos limita seu uso na clínica (VAZQUEZ, 2010; MARINÉ et al., 2015; CONG et al., 2016).

2.3 Fatores de virulência de *Trichosporon* spp.

Alguns fungos são agentes patogênicos oportunistas, os quais possuem vários mecanismos que permitem a sua penetração, instalação e disseminação dentro do hospedeiro, mediada por múltiplos fatores, que podem facilitar o desenvolvimento de uma doença (SUN et al., 2012; MONTROYA et al., 2015). Esses mecanismos são chamados de fatores de virulência, que são, normalmente, relacionados a alterações morfológicas, a capacidade de aderir a uma superfície formando biofilme, termotolerância, expressão de componentes da parede celular, secreção de enzimas e expressão de genes resistentes a antifúngicos (COLOMBO et al., 2011; BENTUBO et al., 2014). Apesar dos fatores de virulência serem expressos genericamente, eles são expressos apenas quando existem condições favoráveis, como teor de nutrientes, disponibilidade de oxigênio e temperatura. Embora, o gênero *Trichosporon* seja a terceira levedura mais comum relacionada a infecções sistêmicas, são poucos os estudos que caracterizam seus fatores de virulência (CHAGAS-NETO et al., 2008; BENTUBO et al., 2014).

Alguns fatores de virulência têm sido descritos em espécies de *Trichosporon*. Além da ocorrência de *switching* fenotípico em colônias de *T. asahii* relatado como um importante fator associado a adesão celular (CHIKAWA et al., 2004), a produção de glucuronoxilomanana (GXM) na parede celular, exoenzimas, como fosfolipases e proteases, e melanina, assim como, a formação de biofilme, compõem os mecanismos de virulência produzidos por espécies de *Trichosporon* para evitar a ação do sistema imunológico contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade dos hospedeiros. Nenhum desses fatores parece ser individualmente responsável pela patogenicidade do fungo, porém as combinações desses fatores atuam determinando as fases da infecção (CHOW et al., 2012; BENTUBO et al., 2014; MONTROYA et al., 2015).

A conversão de blastoconídios em hifas durante a infecção invasiva, assim como em *Candida albicans*, está fortemente associado a virulência do fungo para desencadear infecções (COLOMBO et al., 2011; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013; MORAIS-BRAGA et al., 2015). Estudos realizado com *C. albicans* mostraram que a forma filamentosa possui estrutura que facilita a penetração no tecido, no qual as cepas capazes de filamentar apresentaram maior capacidade de invadir o tecido, ao contrário das que perderam a capacidade de filamentar, diminuiram a habilidade de penetrar no tecido (FELK et al., 2002).

A glucuronoxilomanana é um polissacarídeo composto por manose, xilose e ácido glucurônico que está associado à parede celular tendo função de antígeno em fungos do gênero *Cryptococcus*, compondo a maior parte de sua cápsula. Já se sabe que a GXM produzida por espécies de *Trichosporon* apresentam similaridade com a GXM produzida por *C. neoformans*. Mesmo não sendo relacionado à produção de cápsula em *Trichosporon* spp., a GXM é um importante componente da superfície celular, sendo relacionada ao impedimento da fagocitose por neutrófilos e macrófagos (COLOMBO et al., 2011).

Outro fator de virulência estudado é a capacidade de produzir e secretar exoenzimas capazes de degradar vários componentes do tecido do hospedeiro (CORDEIRO et al., 2015; MONTOYA et al., 2015). A expressão de enzimas como fosfolipases, desoxirribonucleases (DNAses) e proteases está relacionada a maior patogenicidade dos fungos devido à quebra de proteínas e interferência na formação das membranas celulares do hospedeiro, facilitando o processo infeccioso (COLOMBO et al., 2011; MONTOYA et al., 2015).

As desoxirribonucleases, também conhecidas como DNAses, são pouco estudadas em fungos do gênero *Trichosporon* (BENTUBO et al., 2014; MARINÉ et al., 2015; MONTOYA et al., 2015). Porém, Silvestre-Junior (2009) relatou forte atividade de DNAses em cepas de *Trichosporon* em um estudo realizado no Brasil, podendo estar relacionada com a degradação de oligossacarídeos do hospedeiro. As fosfolipases desempenham função de degradar os fosfolipídios da membrana, possibilitando a invasão fúngica na célula do hospedeiro (MARINÉ et al., 2015). Bentubo et al. (2014) mostraram em seus estudos a produção de fosfolipases em cepas de *Trichosporon* spp.. Já as proteases desempenham papel importante para ultrapassar a barreira imunológica dos hospedeiros, porém há uma lacuna da caracterização da real função dessas enzimas para o processo infeccioso, pois algumas cepas são relatadas produtoras de proteases (CORDEIRO et al., 2015) e outras não possuem essa capacidade (SUN et al., 2012), sugerindo-se que seja uma adaptação das cepas patogênicas aos ambientes em que estejam inseridas, tendo um importante papel na patogenicidade desse fungo, garantindo a penetração no tecido (MURRAY, 2006; BENTUBO et al., 2014).

Estudo recente relatou a produção de melanina em *Trichosporon*, na presença de L-DOPA, sendo relacionado à virulência do gênero (CARVALHO et al., 2014). A melanina é um polímero hidrofóbico multifuncional amplamente distribuído nos ambientes naturais. Possui alto peso molecular e é sintetizado através de reações poliméricas oxidativas a partir de compostos fenólicos, adquirindo uma coloração de marrom escuro a preto (CARVALHO et

al, 2014). Alguns estudos já relacionaram a produção de melanina à sobrevivência do fungo no ambiente, a proteção contra o sistema imune do hospedeiro, interferindo na fagocitose pelos macrófagos, bem como, na resistência a antifúngicos. Já se tem vários relatos que a melanina está presente em várias espécies de fungos como; *Cryptococcus neoformans* (CASADEVALL et al., 2000; BRILHANTE et al., 2017), *Sporothrix schenckii* (MORRIS-JONES et al., 2003), *Histoplasma capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2002) e *Paracoccidioides brasiliensis* (GÓMEZ et al., 2001).

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

2.4 Biofilmes

Biofilmes são comunidades microbianas aderidas a uma superfície biótica ou abiótica envolto por uma matriz extracelular polimérica produzida pelas células (DI BONAVENTURA et al., 2006). Espécies do gênero *Trichosporon* apresentam grande capacidade de formação de biofilmes além de produção de enzimas proteolíticas. Estas características estão associadas a uma maior virulência das cepas, de modo que células associadas em biofilme produzem mais proteases que as células planctônicas, além do fenótipo de tolerância aumentada aos antifúngicos quando em biofilmes (CORDEIRO et al., 2015).

Infecções invasivas de *Trichosporon* spp. são geralmente relacionadas a formação de biofilmes em dispositivos médicos invasivos, como cateteres centrais e vesicais (COLOMBO et al., 2011, BENTUBO et al., 2013). A adesão das células de *Trichosporon* spp. a tais superfícies podem promover o desvio da atuação das drogas antifúngicas e burlar o sistema imunológico do hospedeiro, causando infecções mais severas e de difícil tratamento (TRENTIN et al., 2013; TAVERNA et al., 2014).

Os microrganismos encontram-se em dois estágios de vida, como células planctônicas ou sésseis, também conhecidas como biofilmes. A forma de vida sésstil caracteriza a

cronicidade da infecção (TRENTIN et al., 2013). Um estudo revelou que a maioria dos microrganismos não cresce como células individuais, mas em comunidades denominadas biofilme (LÓPEZ et al., 2010).

Biofilmes são comunidades de células microbianas, formados por uma única espécie ou multiespécies, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica envolto por uma matriz exopolissacarídica produzida pelos próprios microrganismos (VAZQUEZ, 2010). A matriz extracelular apresenta funcionalidade química e estrutural aos biofilmes, conferindo maior proteção às células e maior resistência. (DI BONAVENTURA et al., 2006; MONTANARO et al., 2011; ZARNOWSKI et al., 2014; CORDEIRO et al., 2015).

A cinética de formação do biofilme passa por estágios de adesão, desenvolvimento, no qual a matriz extracelular vai sendo produzida pelas próprias células, e o estágio de maturação do biofilme, que culmina com a dispersão celular (Figura 3) (LÓPEZ et al., 2010). Estudos relatam que a hidrofobicidade superficial celular é uma característica importante para a adesão microbiana às superfícies (TRENTIN et al., 2013). Entretanto, durante o processo de desenvolvimento, células fúngicas são constantemente dispersas para o meio externo (TRENTIN et al., 2013). Em biofilme de *Candida*, as células que se desprendem apresentam alta capacidade de adesão a outras superfícies, assim como expressam maior virulência em modelos murino de infecção (UPPULURI et al., 2010), corroborando com o estudo de Cordeiro et al. (2015), o qual relata que as células associadas a biofilmes produzem mais proteases do que as células planctônicas.

Mesmo já sendo descrita em diversos estudos a capacidade de formação de biofilme por espécies de *Trichosporon* e da relevância clínica, sendo associadas a infecções hospitalares, pouco se sabe sobre o processo de formação, desenvolvimento e fisiologia dos biofilmes do referido gênero (DI BONAVENTURA et al. 2006; TRENTIN et al., 2013; ITURRIETA-GONZALES et al., 2014; YANG et al., 2016).

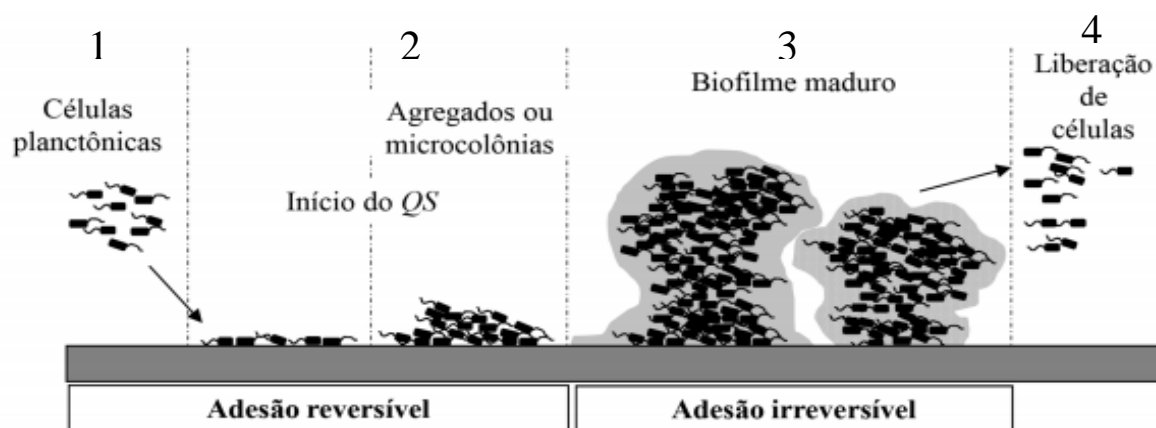


Figura 3: Estágios de desenvolvimento do biofilme. 1. adesão reversível com a formação de microcolônias; 2. adesão irreversível com produção de matriz exopolissacarídica (EPS), e começo da comunicação entre as células; 3. biofilme maduro com estrutura típica de cogumelo permeados por canais de água e 4. a dispersão de células do biofilme maduro. Fonte: Adaptado de Trentin et al., (2009).

Di Bonaventura et al. (2006) foram os primeiros a estudar a cinética de formação e desenvolvimento de biofilme de *T. asahii* em superfície de poliestireno através da microscopia eletrônica, os quais mostraram que as células de *T. asahii* foram capazes de aderir rapidamente à superfície de poliestireno, semelhante aos dados já descritos para biofilme de *Candida* spp. (COLOMBO et al., 2011). Também é percebido que as espécies de *Trichosporon* capazes de formar biofilmes apresentam uma ampla variedade de estruturas morfológicas, como blastoconídios, artroconídios e produção de hifas inseridas na matriz extracelular compondo a ultraestrutura do biofilme maduro após 72 h de incubação (CORDEIRO et al., 2017, ITURRIETA-GONZÁLES et al., 2014), bem como a liberação de ácidos nucléicos para o meio extracelular, carboidratos e proteínas compondo a matriz extracelular durante o seu desenvolvimento (CORDEIRO et al., 2015). Zarnowski et al. (2014) relatam que o DNA na matriz extracelular parece desempenhar um papel estrutural e protetor ao biofilme.

Biofilmes de *T. asahii* têm demonstrado resistência a antifúngicos como anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol (COLOMBO et al., 2011). Vários são os fatores relacionados à baixa sensibilidade dos biofilmes aos antimicrobianos: baixa penetração de agentes químicos, conferido pela barreira física e da interação química da camada de exopolissacarídeos (EPS); crescimento lento de células no interior do biofilme, devido a

redução de metabolismo das células encontradas na base do biofilme, visto que os antimicrobianos, geralmente, atuam na fase de crescimento celular, da densidade populacional do aumento da expressão dos genes alvos das drogas e pelo mecanismo da bomba de efluxo (TRENTIN et al., 2013).

2.5 Sensibilidade a antifúngicos

Apesar de ser crescente a ocorrência de infecções invasivas por *Trichosporon* spp., ainda há poucos estudos que investigam o seu perfil de sensibilidade frente aos compostos antifúngicos (COLOMBO et al., 2011). Acredita-se que a dificuldade existente no tratamento das infecções fúngicas invasivas seja devido a restrita quantidade de fármacos antifúngicos, dos fenômenos de resistência aos mesmos e a falta de padronização dos testes de sensibilidade (ALMEIDA JUNIOR, 2016). Por conta disso, há uma constante necessidade de testes de sensibilidade *in vitro* para avaliar o comportamento dos microrganismos frente as drogas antifúngicas disponíveis no mercado e de outros compostos que podem ter ação antifúngica (POSTERARO et al., 2014; CONG et al., 2016).

As classes dos antifúngicos disponíveis comercialmente são separadas de acordo com o seu mecanismo de ação. Os poliênicos, como a anfotericina B (AMB), se ligam ao ergosterol presente na membrana celular, aumentando a permeabilidade. Os derivados azólicos, assim como os derivados morfolínicos e alilaninas, atuam interferindo na síntese de ergosterol, que é o principal esterol da membrana plasmática fúngica. As equinocandinas inibem a síntese de glucanos, por meio da inibição da enzima 1,3- β glicano, importante componente da parede celular dos fungos (SIDRIM; ROCHA, 2004; KATHIRAVAN et al., 2012).

Estudos demonstram que muitas espécies de *Trichosporon* são resistentes a anfotericina B. *T. asahii* é resistente a anfotericina B, fluconazol e itraconazol (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005; CHAGAS-NETO et al., 2008; TAJ-ALDEEN et al., 2008; ESCARRÁ et al., 2017). Entretanto, o tratamento com voriconazol mostrou sucesso em pacientes com infecções sistêmicas que não responderam a terapia com anfotericina B (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). Os principais mecanismos de resistência para poliênicos são alterações na quantidade de ergosteróis de membrana ou produção de outros esteroides de membrana que não o ergosterol (FILIPPIN; SOUSA, 2006)

A capacidade do gênero *Trichosporon*, em especial a espécie *T. asahii*, de formar biofilmes em dispositivos médicos pode explicar a resistência clínica aos antifúngicos e as altas taxas de mortalidade (COLOMBO et al., 2011; CONG et al., 2016). Embora os triazólicos tenham demonstrado, *in vitro*, boa atividade contra células planctônicas de *T. asahii*, já se tem resultados de baixa atividade quando associados a biofilmes, podendo resultar em falha terapêutica clínica (CONG et al., 2016).

Em geral, os mecanismos de resistência aos antifúngicos em células associadas ao biofilme são relacionados principalmente pela densidade populacional, pelos compostos que compõem a matriz extracelular, que sequestram as drogas, aumento da expressão dos genes alvos das drogas e bomba de efluxo (COLOMBO et al., 2011; RAMAGE et al., 2012; TRENTIN et al., 2013).

O ergosterol presente na membrana das células fúngicas é um dos principais alvos dos fármacos antifúngicos de uso clínico, como polienos e azólicos. Dessa forma, alterações no gene *ERG11* aumentam a produção de ergosterol, resultando na resistência de biofilmes de *Trichosporon* spp. aos polienos e azólicos (RAMAGE et al., 2012; CONG et al., 2016).

A matriz exopolimérica dos biofilmes desempenham um papel importante de proteção das células fúngicas contra a resposta imune do hospedeiro, além de funcionar como uma barreira físico-química que impede a penetração dos antifúngicos. A sua composição por carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos é responsável por manter a estrutura organizada (CHAGAS-NETO et al., 2008; LÓPEZ et al., 2010; MARTINS et al., 2010).

Os biofilmes de *Trichosporon* spp. também podem desenvolver resistência aos antifúngicos, principalmente os azólicos, mediado pelo mecanismo de bomba de efluxo, que são proteínas de membrana que atuam no transporte ativo de substância para dentro e fora da célula. O aumento da expressão dos genes que codificam essas proteínas acarreta na diminuição do fármaco no interior da célula (RAMAGE et al., 2012; CONG et al., 2016).

Dessa forma, conhecer e compreender a composição e os mecanismos fisiológicos dos antifúngicos em cepas de *Trichosporon* spp. é de fundamental importância para desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (LÓPEZ et al., 2010; RAMAGE et al., 2012; CONG et al., 2016).

2.6 Molécula de Farnesol

A molécula de farnesol foi descrita inicialmente por Hornby et al. (2001) como uma molécula de *quorum sensing* sintetizada por *Candida albicans*. Farnesol é uma molécula de fórmula química (C₁₅H₂₆O) (Figura 4), é um álcool sesquiterpeno constituído por três unidades de isopreno, apresentando-se como um líquido incolor, insolúvel em água, porém miscível em óleos. Na verdade, o farnesol foi descoberto pela primeira vez como constituinte de óleos essenciais de uma ampla gama de plantas, como erva-de-limão, rosas e muitas frutas e vegetais exercendo atividade antimicrobiana (KUETE-EFFERTH, 2013).

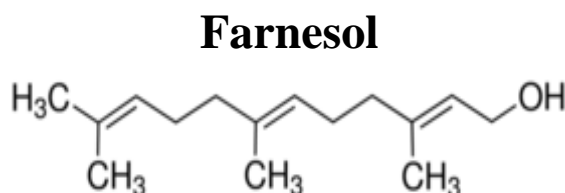


Figura 4: Fórmula estrutural da molécula farnesol.

Fonte: Sigma, USA.

O farnesol é uma molécula que atua como um sinalizador de *quorum sensing*, uma comunicação entre células, estando envolvido na inibição da transição morfológica de blastoconídios para forma filamentosa, para inibir a colonização de diferentes ambientes, e da formação de biofilmes (HORNBY et al., 2001; JABRA-RIZK et al., 2006; BANDARA et al., 2012; BRILHANTE et al., 2013; EGBE et al., 2016). É gerado de forma endógena por desfosforilação enzimática do farnesil difosfato, um precursor da síntese de esteróis na via de biossíntese do ergosterol (JABRA-RIZK et al., 2006; SILVA, 2009).

Alguns estudos têm demonstrado que o farnesol possui uma elevada atividade antimicrobiana, tanto frente a bactérias (CASTELO-BRANCO et al., 2015), quanto frente a fungos, com destaque para inibição de biofilme bacteriano relatado por Jabra-Rizk et al. (2006) (BRILHANTE et al., 2012; CORDEIRO et al., 2012; FERNANDES et al., 2016).

O efeito do farnesol na inibição de formação de biofilmes em levedura do gênero *Candida* está bem descrito. Porém o mecanismo de ação do farnesol ainda não está completamente entendido, mas se acredita que a molécula cause danos na membrana da célula fúngica, prejudicando a síntese de ergosterol (JABRA-RIZK et al., 2006; DERENGOWSKI et al., 2009), assim como, diminuição da produção de β -lactamase em cepas de bactérias incubadas com farnesol (KURODA et al., 2007). Egbe et al. (2017), em seu estudo relata que farnesol inibe a síntese de proteínas e o processo inicial de tradução, além da interferência negativa no crescimento de *C. albicans* e *S. cerevisiae*.

Além do efeito de inibição de crescimento, estudo de Navarathna et al. (2007) relata que o excesso de farnesol secretado durante a infecção aumenta a virulência de *Candida albicans* devido a alteração da fluidez da membrana das células do hospedeiro, facilitando a penetração no tecido, causando aumento da mortalidade de camundongos.

Nos últimos anos, devido aos relatos recorrentes de resistência aos antifúngicos clássicos, o farnesol vem sendo estudado como potencializador da ação dos antifúngicos, como no caso do fluconazol. Pois apresenta a capacidade de inibir as reações oxi-redução da bomba de efluxo da célula microbiana. Assim, indica-se a aplicação desse composto como um agente antifúngico coadjuvante para prevenção de infecções (JABRA-RIZK et al., 2006; CORDEIRO et al, 2013; CASTELO-BRANCO et al., 2015; EGBE, et al., 2017).

3 HIPÓTESES

1. O farnesol possui ação antimicrobiana frente a cepas de *T. asahii* e *T. inkin* na forma planctônica;
2. O farnesol possui ação inibitória na adesão e desenvolvimento dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*;
3. O farnesol age sobre biofilmes maduros de cepas de *T. asahii* e *T. inkin*;
4. O farnesol tem efeito sinérgico com drogas antifúngicas em crescimento planctônico de *T. asahii* e *T. inkin*;
5. O farnesol aumenta a produção de protease em crescimento planctônico e em biofilme de *T. asahii* e *T. inkin*;
6. O farnesol inibe a filamentação de *T. asahii* e *T. inkin*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar o efeito inibitório do farnesol frente ao crescimento planctônico, formação de biofilmes e no biofilme maduro de cepas de *T. asahii* e *T. inkin*, bem como, verificar a ação do farnesol sobre a filamentação e a produção de proteases das cepas de *Trichosporon*.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do farnesol frente às cepas de *T. asahii* e *T. inkin* na forma planctônica.
2. Determinar a concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) do farnesol frente às cepas de *T. asahii* e *T. inkin*.
3. Avaliar a interação, *in vitro*, do farnesol em combinação com anfotericina B; fluconazol e voriconazol frente às cepas de *T. asahii* e *T. inkin*.
4. Analisar a ação do farnesol sobre a produção de protease em crescimento planctônico e em biofilme de *T. asahii* e *T. inkin*.
5. Verificar a ação do farnesol na micromorfologia de *T. asahii* e *T. inkin*.
6. Analisar a interferência do farnesol na morfologia e viabilidade celular dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.

5 METODOLOGIA

5.1 Locais de estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Centro Especializado em Microbiologia Médica (CEMM), Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina – UFC. A análise topográfica dos biofilmes por meio de microscopia eletrônica de varredura foi realizada na Central Analítica do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

5.2 Microrganismos

Foram avaliados isolados clínicos de *T. asahii* (n=3) e *T. inkin* (n=7) pertencentes à micoteca do CEMM, conforme apresentado na Tabela 1. Os microrganismos foram recuperados do estoque mediante repique em ágar Batata dextrose (Acumedia, EUA) por 48 h a 35 °C. A identificação das cepas foi baseado na análise micromorfologia em ágar Malte (HIMEDIA, Brasil) (DE HOOG et al., 2000) e por sequenciamento da região IGS do rDNA (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 05-6-072	<i>T. asahii</i>	Urina
CEMM 05-6-073	<i>T. asahii</i>	Cateter
CEMM 03-1-072	<i>T. asahii</i>	Pele
CEMM 05-6-074	<i>T. inkin</i>	Urina
CEMM 05-6-075	<i>T. inkin</i>	Área perigenital
CEMM 03-1-073	<i>T. inkin</i>	Pele
CEMM 01-1-144	<i>T. inkin</i>	Pele
CEMM 01-1-143	<i>T. inkin</i>	Pele
CEMM 01-1-145	<i>T. inkin</i>	Urina
CEMM 03-1-072	<i>T. inkin</i>	Cabelo com piedra branca
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	Escarro

CEMM= Centro Especializado em Micologia Médica ATCC=American Type Culture Collection

5.3 Drogas

Foram testadas duas drogas antifúngicas: anfotericina B (AMB – Sigma, EUA), fluconazol (FLZ – Pfizer, Brasil) e o composto farnesol (Sigma, EUA).

Fluconazol foi diluído em água destilada e anfotericina B foi diluído em DMSO 100% conforme o documento M27 – A3 do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). A solução inicial de farnesol na concentração de 1196,1 mM foi diluída apenas no momento de uso em metanol 100% (v/v). Posteriormente a solução inicial foi diluída em meio RPMI 1640 de modo a concentração inicial de trabalho do metanol ficou a 0,97%, não interferindo no crescimento de *T. asahii* e *T. inkin* (FERNANDES et al., 2016; DERENGOWSKI et al., 2009).

Como parâmetro de concentração, foram usadas as descrições feitas por Fernandes et al. (2016) os quais testaram farnesol frente a *C. albicans*. Assim, as concentrações de farnesol testadas para forma planctônica foram de 2,33 – 1196,1 μ M.

5.4 Teste de sensibilidade *in vitro*

O perfil de sensibilidade em crescimento planctônico foi realizado conforme o documento M27-A3 estabelecido pelo CLSI (CLSI, 2008), utilizando a técnica de microdiluição em caldo em meio RPMI 1640 tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS- Sigma, St. Louis) em pH 7,0. Anfotericina e voriconazol foram testadas nas concentrações de 0,031 a 16 μ g/ml; fluconazol foi testado nas concentrações de 0,125 a 64 μ g/ml. Para o teste de farnesol foram testadas as concentrações de 2,33 – 1196,1 μ M (FERNANDES et al., 2016; DERENGOWSKI, et al., 2009).

Para tanto, os isolados foram previamente cultivados em ágar batata dextrose e incubados por 48 h a 35 °C. A partir dessas colônias, uma suspensão de células foi preparada em salina estéril com turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland ($2,5 \times 10^6$ células/ml) em seguida, foram feitas diluições nas proporções de 1:50 e depois de 1:20 em meio RPMI tamponado com MOPS em pH 7,0.

Para realização do teste, foram usadas placas de 96 poços com capacidade de 200 μ L, os quais foram previamente adicionados 100 μ L de RPMI em cada poço. Em seguida,

acrescentou-se 100 µL da droga na primeira coluna, em uma concentração quatro vezes maior do que a esperada no primeiro poço e, posteriormente, a droga foi diluída em escala de 1:2 até a décima coluna. Como controle de qualidade do teste de sensibilidade, foi utilizada a cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 com os antifúngicos. As placas foram então incubadas a 35 °C por 48 h e a interpretação dos resultados foi realizada por meio de leitura visual (CLSI, 2008). O experimento foi realizado em duplicata e reproduzido independente em dias diferentes.

A concentração inibitória mínima (CIM) para AMB foi determinada como sendo a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento fúngico; para FLZ a CIM foi definida como 50% de inibição do crescimento fúngico (CIM₅₀) quando comparado ao controle, para o composto farnesol, foram determinados os valores de CIM_{50%} e CIM_{80%} para as menores concentrações capazes de inibir o crescimento fúngico em 50% e 80% quando comparado ao controle de crescimento, respectivamente.

5.5 Interação entre farnesol e antifúngicos

Após a determinação do CIM de cada cepa isoladamente, foi feita a combinação de drogas antifúngicas e farnesol para verificar a presença de sinergismo. Para isso, selecionamos uma cepa representativa de cada espécie, as quais serão utilizadas para outros testes.

A interação entre farnesol e os antifúngicos AMB e FLZ, frente a *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074, foi realizada pelo método de *Checkerboard* (tabuleiro de xadrez) em microdiluição em caldo, (ODDS, 2003; CORDEIRO et al, 2016). O farnesol foi testado nas concentrações de 2,33 – 299 µM, associados às concentrações de AMB (0,0078 – 4 µg/mL) e FLZ (0,0156 – 8 µg/ml). Decorrido as 48 h de incubação a 35 °C, os valores de CIM para cada antifúngico e sua interação foram determinados por leitura visual de acordo com os parâmetros estabelecidos para sensibilidade de crescimento planctônico.

A interação entre as drogas e o composto foi analisada pelo cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), definido pelo cálculo da soma dos valores das concentrações inibitórias combinadas (CIM_A e CIM_B), dividida pelas concentrações inibitórias isoladas do farnesol e de cada antifúngico, como mostrado a seguir:

$$\text{ICIF} = \frac{\text{CIM}_A \text{ em combinação}}{\text{CIM}_A \text{ isolada}} + \frac{\text{CIM}_B \text{ em combinação}}{\text{CIM}_B \text{ isolada}}$$

Após a análise dos resultados, foram adotados os seguintes parâmetros de análise: $\text{ICIF} \leq 0,5$ representa sinergismo, $\text{ICIF} > 4,0$ representa antagonismo e $0,5 < \text{ICIF} < 4$ representa sem interação (ODDS, 2003).

5.6 Efeito do farnesol na filamentação de *Trichosporon* spp.

Para determinar o efeito do farnesol sob a morfologia de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074, foi utilizada a metodologia descrita por Morais-Braga et al. (2017), com adaptações. Para tanto, foram preparadas placas de Petri com ágar malte com farnesol nas concentrações 598 μM e 1196,1 μM , concentrações referentes a $\text{CIM}_{80\%}$ e 2 vezes a $\text{CIM}_{80\%}$, concentrações mais altas CIM devido a disponibilidade do composto em meio sólido, e placas sem adição do composto para comparação dos controles. Posteriormente, foi feita a técnica de microcultivo para fungo filamentoso como descrito por Sidrim e Rocha (2010) e deixados a temperatura ambiente por 5 a 7 dias, até que se observasse o desenvolvimento de hifas. Passados os dias, retirou-se a lamínula com o auxílio de uma pinça e colocou sobre uma lâmina de vidro com uma gota de lactofenol azul de algodão. A lâmina foi observada ao microscópio óptico com a objetiva de 40x e registradas fotografias de 10 campos de cada condição. Assim, foi montada uma prancha de imagens para comparações das condições com os respectivos controles dos representantes das duas espécies de *Trichosporon*.

5.7 Células associadas em biofilme de *T. asahii* e *T. inkin*

5.7.1 Efeito do farnesol sobre a adesão celular

O teste de sensibilidade de biofilme frente ao farnesol foi realizado com as dez cepas inicialmente selecionadas para o estudo. Os biofilmes foram formados segundo a metodologia descrita por Cordeiro et al. (2015). Para investigar o efeito do farnesol sobre o processo de adesão celular, as cepas foram inicialmente cultivadas em ágar batata por 48 h a 35 °C. A

partir dessa cultura, os inóculos foram ajustados na concentração inicial de $2,5 \times 10^6$ células/ml, por contagem em câmara de Neubauer, em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS a pH 7,0. Em seguida, 100 μ L de cada inóculo foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo chato, previamente preparadas com 100 μ L de RPMI 1640 pH 7,0 acrescidos de farnesol nas concentrações 37,37 a 1196,1 μ M. As placas foram incubadas a 35 °C sob agitação de 80 rpm por 6 h (CORDEIRO et al., 2015).

Decorrido o tempo referente à adesão celular, os sobrenadantes foram aspirados e cada poço lavado duas vezes com PBS-Tween 20 (0,05% v/v) para remoção das células não aderidas (CORDEIRO et al., 2015). A atividade metabólica de cada biofilme foi avaliada pelo ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]2H-hidroxido de tetrazólio (XTT). Todo o experimento foi conduzido em duplicata.

5.7.2 Efeito do farnesol no desenvolvimento do biofilme

Os biofilmes de *Trichosporon* spp. foram formados como descritos acima por Cordeiro et al. (2015), deixando o momento de adesão sem interferência de droga. Após o período de adesão de 6 h, todo o sobrenadante foi cuidadosamente removido e os poços lavados duas vezes com PBS-Tween 20 estéril. O farnesol, diluído em meio RPMI 1640 pH 7,0, foi acrescido aos biofilmes num volume de 200 μ L em concentração de 37,37 – 1196,1 μ M para cada cepa e incubados novamente por 24 h e 48 h a 35 °C. Após cada intervalo de tempo (24 h e 48 h), os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS-Tween 20 e analisados quanto à viabilidade metabólica por XTT e biomassa pelo ensaio de coloração por cristal violeta. Todo o experimento foi conduzido em duplicata.

5.7.3 Efeito do farnesol frente ao biofilme maduro

Os biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* foram formados conforme descrito previamente. Após o período de adesão de 6 h, o sobrenadante foi removido e os biofilmes lavados em PBS-Tween 20 estéril e acrescido de 200 μ L de RPMI pH 7,0 em cada poço e incubados por 48h a 35°C. Decorridas as 48 h, quando o biofilme encontrava-se maduro, cada poço foi lavado com PBS-Tween 20, para remoção dos resíduos celulares, e acrescidos de 200 μ L de farnesol diluído em RPMI pH 7,0 nas concentrações de 37,37 a 1196,1 μ M, os biofilmes

foram incubados novamente por 48 h a 35 °C. Para análise do biofilme, foi feito ensaio de XTT para viabilidade metabólica e coloração por cristal violeta para biomassa. Todo o experimento foi conduzido em duplicata (CORDEIRO et al., 2015).

5.7.4 Efeito do farnesol na produção de proteases

O efeito do farnesol na produção de protease de células planctônicas e em biofilme de *T. asahii* e *T. inkin* foi avaliado usando azoalbumina como substrato proteico. Para análise de crescimento planctônico, inóculos iniciais de 10^6 células/mL foram incubados juntamente com farnesol nas concentrações 74,75 e 149,5 μ M em meio RPMI 1640 e sem farnesol, como controle livre de droga, em microplacas e então incubadas a 35 °C e 80 rpm por 24 e 48 h. Para análise em biofilme, inóculos iniciais de 10^6 células/mL foram adicionados a placas de 96 poços de fundo chato, já previamente preparadas com RPMI ou RPMI com farnesol nas concentrações de 74,75 e 149,5 μ M como descrito acima. Após o período de incubação de 6 h, os biofilmes foram lavados com PBS-Tween e o composto foi repostado nas mesmas concentrações e incubados novamente. A atividade da protease foi avaliada após 24 e 48h de incubação conforme descrito por Cordeiro et al. (2016), a partir de protocolo originalmente descrito por Charney e Tomarelli (1947).

Para cada tempo de análise, 200 μ L dos cultivos (planctônico e raspado do biofilme) foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram misturados com 200 μ L de azoalbumina a 0,3 % e incubados em banho maria a 37 °C por 3 h. A reação enzimática foi interrompida com 1600 μ L de ácido tricloroacético 5% seguido da adição de 0,5 M de NaOH. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 440 nm.

5.7.5 Métodos quantitativos para análise dos biofilmes

5.7.5.1 Atividade metabólica

A análise metabólica dos biofilmes, nos diferentes tempos de cultivo, foi realizada com o ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]2H-hidroxido de tetrazólio (XTT), conforme descrito por Martinez e Casadevall (2006), com alterações. Após as lavagens, todo o PBS foi removido,

cuidadosamente, e os poços contendo os biofilmes foram preenchidos com 50 μL de PBS estéril, 75 μL da solução de XTT estéril (1 mg/mL em PBS – Sigma, EUA) e 6 μL de menadiona (1 mM em acetona – Sigma, EUA), somando um total de 131 μL em cada poço. Todo o processo foi realizado sobre proteção da luz direta. As placas foram incubadas por 5 h a 35 °C sobre proteção luminosa. Decorridas as 5 h a solução de XTT foi transferida para outra placa de fundo chato com 96 poços e a mesma foi lida em espectrofotômetro a 492 nm. A atividade metabólica dos biofilmes foi medida pela mudança colorimétrica da atividade das desidrogenases mitocondriais, que reduzem XTT a formazan (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

5.7.5.2 *Biomassa*

A biomassa dos biofilmes foi avaliada pela técnica de coloração por cristal violeta (PEETERS et al., 2008). Após o cultivo, os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS-Tween 20 estéril, em seguida foram desidratados com 200 μL de metanol (Dinâmica, Brasil) por aproximadamente 5 min, o volume foi removido e deixado secar para retirada total do metanol. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas de 200 μL de cristal violeta a 0,3% e deixado por 20 min de incubação. O corante foi removido e as placas foram delicadamente lavadas com água destilada estéril por duas vezes. Após as lavagens, o corante impregnado no biofilme foi removido pela adição de 200 μL de ácido a 33% (v/v) durante 30 segundos. O sobrenadante foi removido e transferido para novas placas de fundo chato com 96 poços e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 590 nm (PEETERS et al., 2008). Todo o experimento foi realizado em duplicata.

5.7.6 **Morfologia e estrutura dos biofilmes**

5.7.6.1 *Microscopia Eletrônica de Varredura*

Para análise de microscopia eletrônica de varredura, os biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074, foram formados em lâminas de Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, New York City, EUA), conforme descrito acima, com adição do farnesol

nas concentrações de 598 μM e 1196,1 μM nas três condições (adesão, formação e biofilme maduro), comparado sempre com os respectivos controles.

Os biofilmes foram fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M e um corante catiônico azul de alcian 0,1% e incubados a 4 °C overnight. Os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato de sódio 0,15 M e desidratados com lavagens seriadas de álcool nas concentrações 50%, 70%, 80%, 95% e 100%, por 10 minutos, duas vezes cada. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com hexametildisilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 minutos. Em seguida à retirada do hexametildisilazano, as lâminas foram secas no dessecador com sílica por 24h conforme descrito por Di Bonaventura et al. (2006) (CORDEIRO et al., 2015). Para realização da técnica de microscopia, as lâminas foram recobertas com ouro pela máquina metalizadora Emitech Q150T. As superfícies foram examinadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV) (FEI Inspect S50) em alto vácuo a 15KV. As imagens capturadas foram processadas em *software Photoscape*, v.3.6.5 (MooiTech, Korea).

5.7.6.2 Microscopia Confocal

A interferência do farnesol sobre a ultraestrutura e viabilidade dos biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074, foram avaliadas pela microscopia confocal, de acordo com Di Bonaventura et al. (2006). Os biofilmes foram formados, conforme descrito acima, em lâmina de Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, New York City, NY) em placas de 24 poços com farnesol nas concentrações 598 μM e 1196,1 μM . As análises foram feitas nas condições de adesão, formação e biofilme maduro.

As lâminas de thermanox foram cobertas com 200 μL do corante de fluorescência *Live/Dead*™ (Invitrogen - MA). Após 30 min, as lâminas foram então avaliadas em Microscópio Confocal Nikon C2, com comprimento de onda de 488 nm para detecção do corante SYTO9, que identifica células viáveis em verde, e a 561 nm para detecção do iodeto de propídio, que indica células não viáveis. Para análise das imagens, foram escolhidos 5 campos das imagens tridimensionais e a quantificação colorimétrica, bem como a mensuração do *Z-slice* foram realizadas usando software *ImageJ* 1.50i (COLLINS, 2007).

5.8 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância ANOVA e os testes de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey's, para os dados paramétricos e pós-teste de Dunn's para os dados não paramétricos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® 7.0 (GraphPad Software, EUA).

6. RESULTADOS

6.1 Efeito do farnesol sobre o crescimento planctônico de *T. asahii* e *T. inkin*

Os resultados da sensibilidade das células planctônicas das 3 cepas de *T. asahii* e das 7 cepas de *T. inkin* frente ao farnesol, anfotericina B e fluconazol está apresentada na Tabela 2. O farnesol foi capaz de reduzir em 50% o crescimento planctônico das cepas de *T. asahii* no intervalo de concentrações de 74,75 a 149,5 μM . Para inibição de 80% do crescimento, foi necessária a concentração de 598 μM de farnesol. Já para as cepas de *T. inkin*, a redução de 50% do crescimento planctônico em contato com farnesol se deu nos intervalos de concentrações de 37,37 a 149,5 μM . A redução do crescimento de 80% se deu nos intervalos de 74,75 a 598 μM . A CIM da anfotericina B variou entre 0,125 a 2 $\mu\text{g/mL}$ para *T. asahii* e 0,0312 a 2 $\mu\text{g/mL}$ para *T. inkin*. Para fluconazol, os valores de CIM variaram entre 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$ para *T. asahii* e 0,5 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para *T. inkin*.

Tabela 2: Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Trichosporon asahii* e *T. inkin* frente ao composto farnesol

Espécie	Farnesol μM				Anfotericina B $\mu\text{g/mL}$		Fluconazol $\mu\text{g/mL}$	
	CIM 50		CIM 80		CIM		CIM 50	
	Intervalo	Média \pm dp*	Intervalo	Média \pm dp*	Intervalo	Média \pm dp*	Intervalo	Média \pm dp*
<i>T. asahii</i> (n=3)	74,75 - 149,5	117,7 \pm 1,48	598	598 \pm 1	0.0312 - 2	0.396 \pm 0.984	0.5 - 4	1,786 \pm 1,967
<i>T. inkin</i> (n=7)	37,37 - 149,5	91,12 \pm 1,68	74,75 - 598	299 \pm 2	0.125 - 2	0.168 \pm 0.745	4 - 8	5,333 \pm 1,492

*Média geométrica \pm desvio padrão

6.2 Interação entre drogas

Após a determinação dos valores de CIM para as drogas antifúngicas isoladamente, a interação das drogas antifúngicas com o farnesol foi determinada. As combinações testadas de (fluconazol + farnesol) e (anfotericina B + farnesol) para cepas de *T. asahii* e *T. inkin* se mostraram indiferentes, evidenciados pelos valores de ICIF demonstrados na tabela 3.

6.3 Efeito do farnesol na micromorfologia de *T. asahii* e *T. inkin*

Com base nos resultados da CIM obtidos no teste de sensibilidade, foram realizados testes para verificar se o farnesol era capaz de interferir na transição morfológica de levedura para hifas. Para isso, preparamos um ambiente pobre em nutriente, com intuito de estressar o fungo, estimulando o seu potencial dimórfico. Com isso, o sesquiterpeno farnesol nas concentrações de 598 μM e 1196,1 μM , os quais correspondem, respectivamente, a $\text{CIM}_{80\%}$ e a 2 vezes a $\text{CIM}_{80\%}$ para crescimento planctônico, foi capaz de reduzir a transição fenotípica de levedura para hifas de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074, em comparação ao controle livre do composto. O controle do crescimento demonstrou a viabilidade da transição morfológica, de blastoconídios (seta a) para hifas (seta b), permitida pelo ambiente pobre em nutrientes. Já no microcultivo com o composto farnesol, houve a redução de filamentação na medida em que se aumentou a concentração do composto, sendo predominantes os blastoconídios, como mostrado na Figura 5.

Tabela 3: Interação do farnesol com anfotericina B e fluconazol para *T. asahii* e *T. inkin*

ISOLADOS	FAR μM	AMB $\mu\text{g/mL}$	FLZ $\mu\text{g/mL}$	FAR/AMB			RESULTADO	FAR/FLZ			RESULTADO
	CIM	CIM	CIM	CIC FAR	CIC AMB	ICIF		CIC FAR	CIC FLZ	ICIF	
CEMM 05-6-072	149,5	0,25	2	149,5	0,125	1,5	Indiferente	149,5	4	3	Indiferente
CEMM 05-6-074	74,75	0,125	1	74,75	0,0312	1,24	Indiferente	74,75	2	3	Indiferente

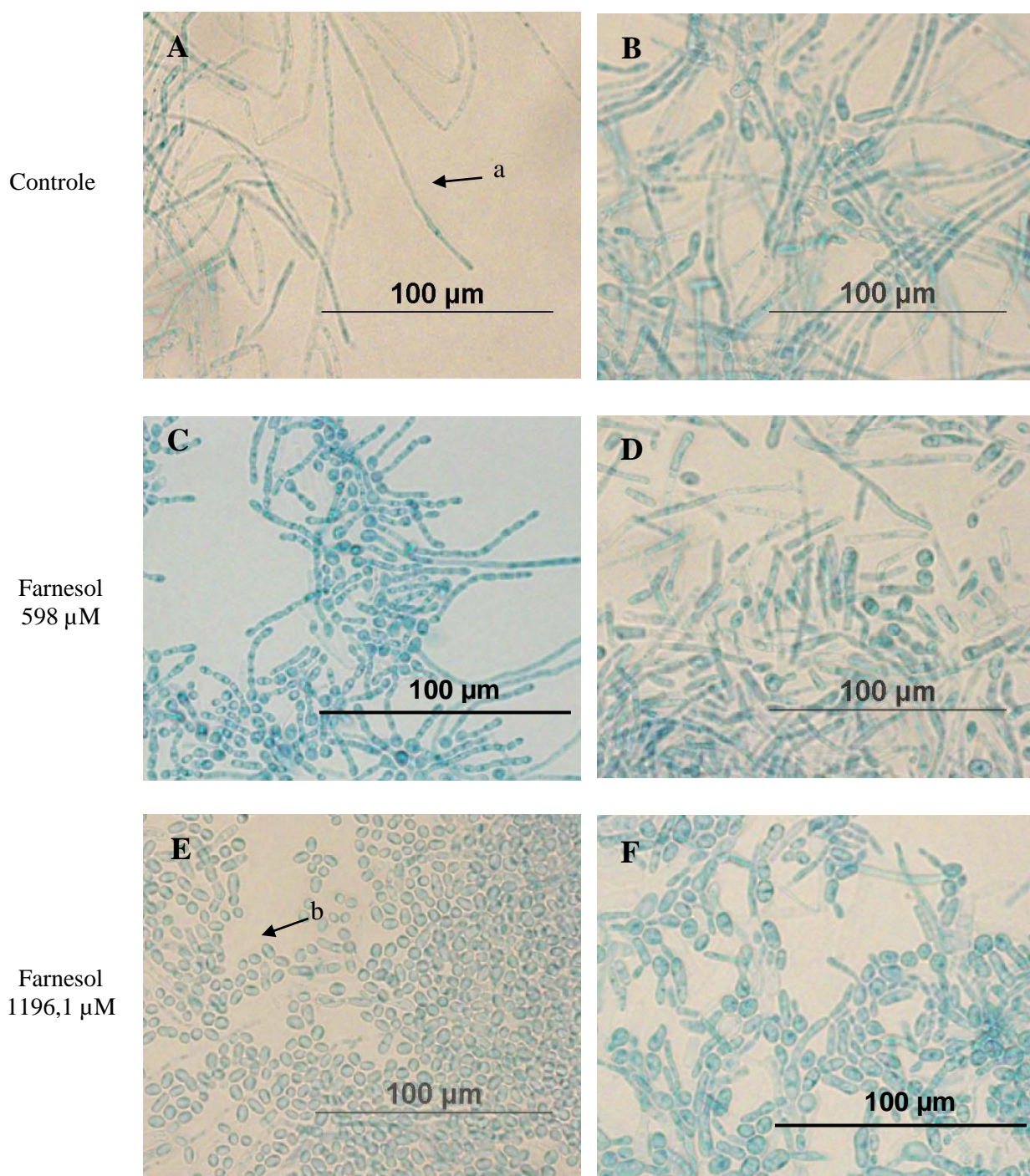
*Trichosporon asahii**Trichosporon inkin*

Figura 5: Efeito do farnesol na filamentação de *T. asahii* e *T. inkin* feito por microcultivo. A e B são os controles de crescimento sem adição do composto; C e D representam crescimento fúngico com interferência do composto farnesol a 598 μM e E e F representam o crescimento fúngico com interferência do composto a 1196,1 μM . Na seta (a) estrutura filamentosa, hifas arthroconidiadas hialinas e seta (b) estrutura de blastoconídio. Aumento de 400x.

6.4 Efeito do farnesol sobre biofilme de *T. asahii* e *T. inkin*

6.4.1 Efeito do farnesol sobre a adesão celular

Nas primeiras 6 h de adesão, o farnesol reduziu a viabilidade celular em torno de 40% na concentração de 37,37 μM ($p < 0,0022$) para cepas de *T. asahii*. A viabilidade celular foi reduzida cerca de 80% na concentração de 299 μM ($p = 0,0001$), permanecendo-se constante nas demais concentrações (Figura 6A). Para as cepas de *T. inkin*, o farnesol causou inibição de aproximadamente 50% da viabilidade do biofilme na concentração 149,5 μM ($p < 0,0001$). Na concentração 598 μM de farnesol houve redução da viabilidade em aproximadamente 80%, permanecendo constante nas concentrações superiores (Figura 6B).

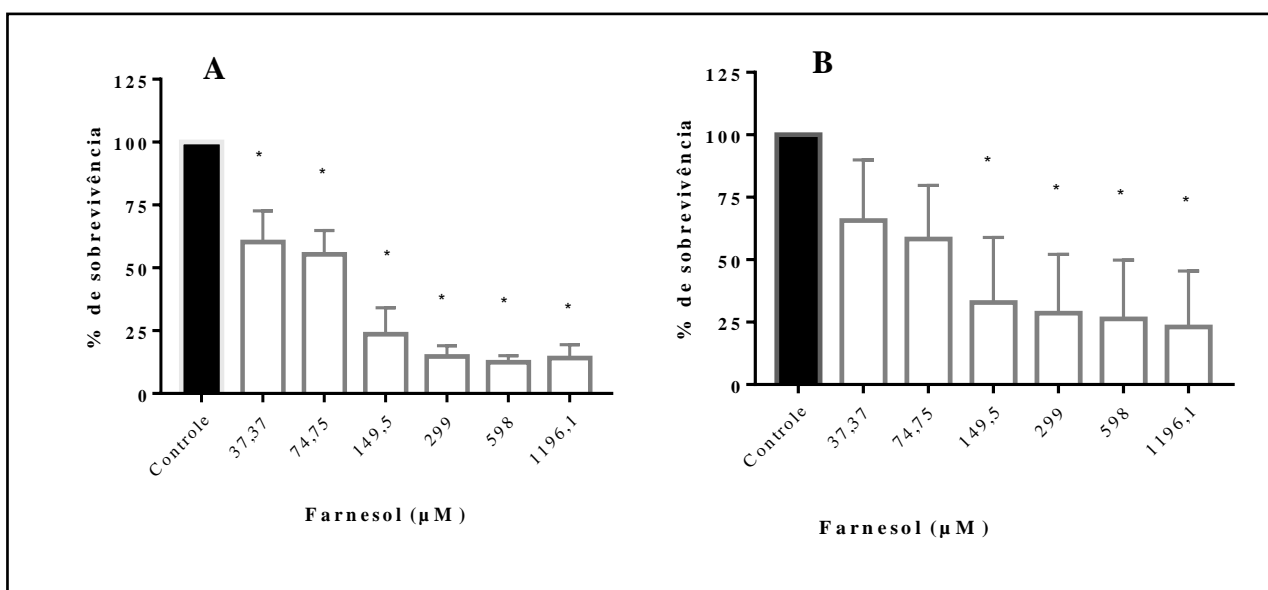


Figura 6: Inibição da adesão celular das células de *T. asahii* ($n=3$) (A) e *T. inkin* ($n=7$) (B) na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 37,37 a 1196,1 μM avaliada pelo ensaio de redução de XTT a 492 nm. Controles sem farnesol (barras pretas). Os asteriscos representam de onde começam as diferenças estatísticas em comparação ao controle sem tratamento ($p > 0,05$).

Observou-se que o farnesol reduziu o processo de formação do biofilme, pois nas espécies de *T. asahii*, houve redução da atividade metabólica e biomassa ($p < 0,001$) nas

concentrações 149,5 μM e 299 μM , respectivamente (Figura 7A e 7B). Para *T. inkin*, houve redução em torno de 50% da viabilidade celular e biomassa na concentração de 149,5 μM ($p < 0,003$) (Figura 7C e 7D).

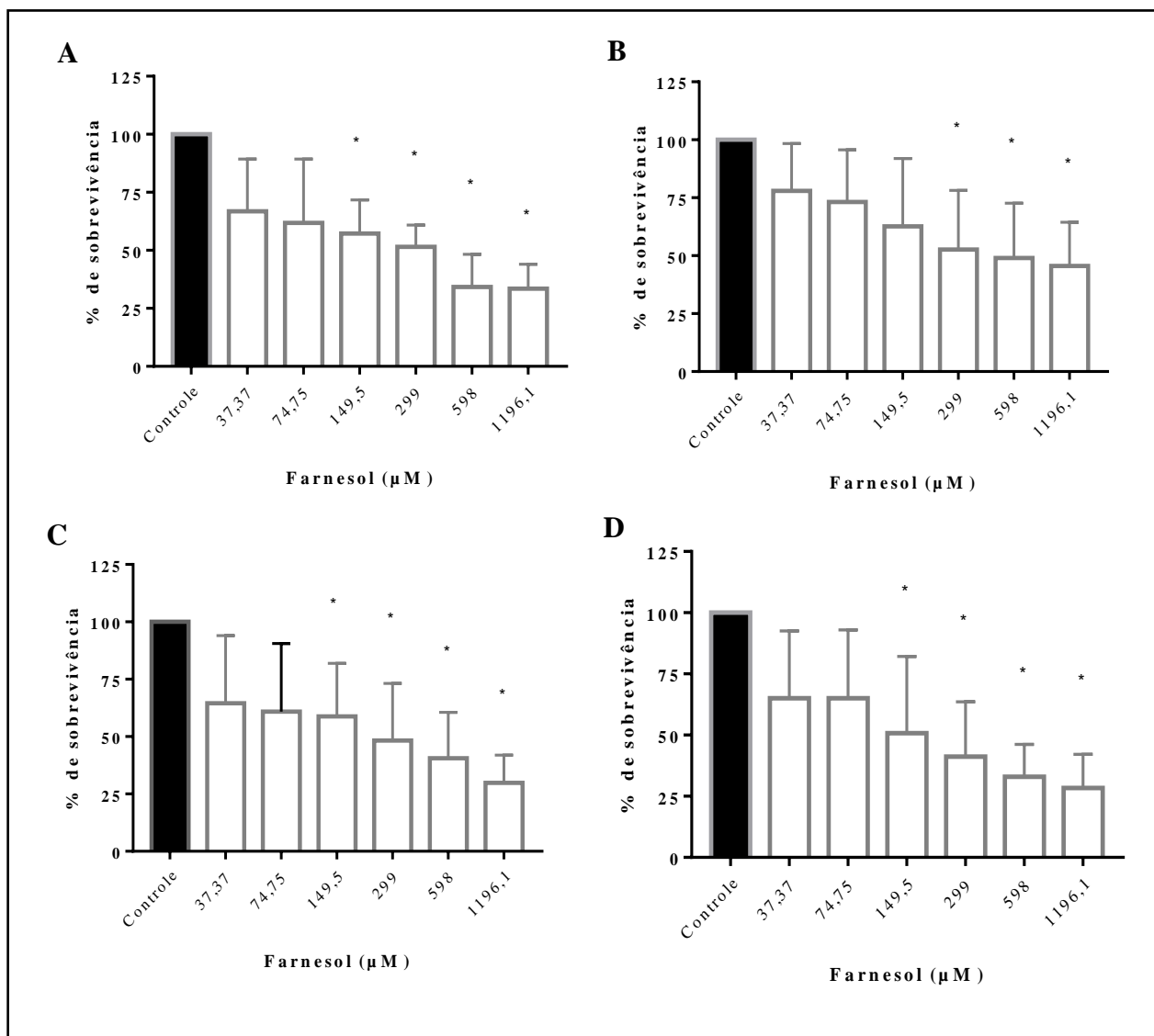


Figura 7: Inibição do desenvolvimento de biofilmes de cepas de *T. asahii* ($n=3$) e *T. inkin* ($n=7$) na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 37,37 a 1196,1 μM após o momento de adesão celular e controles sem farnesol (barras pretas). (A e C) Atividade metabólica pelo ensaio de redução de XTT de cepas de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente. (B e D) Biomassa por coloração com cristal violeta de cepas de *T. asahii* e *T. inkin*. Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle ($p > 0,05$).

6.4.3 Efeito do farnesol no biofilme maduro

O farnesol reduziu em 50% a atividade metabólica e biomassa do biofilme maduro de *T. asahii* nas concentrações de 598 μM e 149,5 μM , respectivamente (Figura 8A e 8B). Para as cepas de *T. inkin*, houve redução da atividade celular e biomassa em torno de 50% na concentração de 299 μM de farnesol (Figura 8C e D).

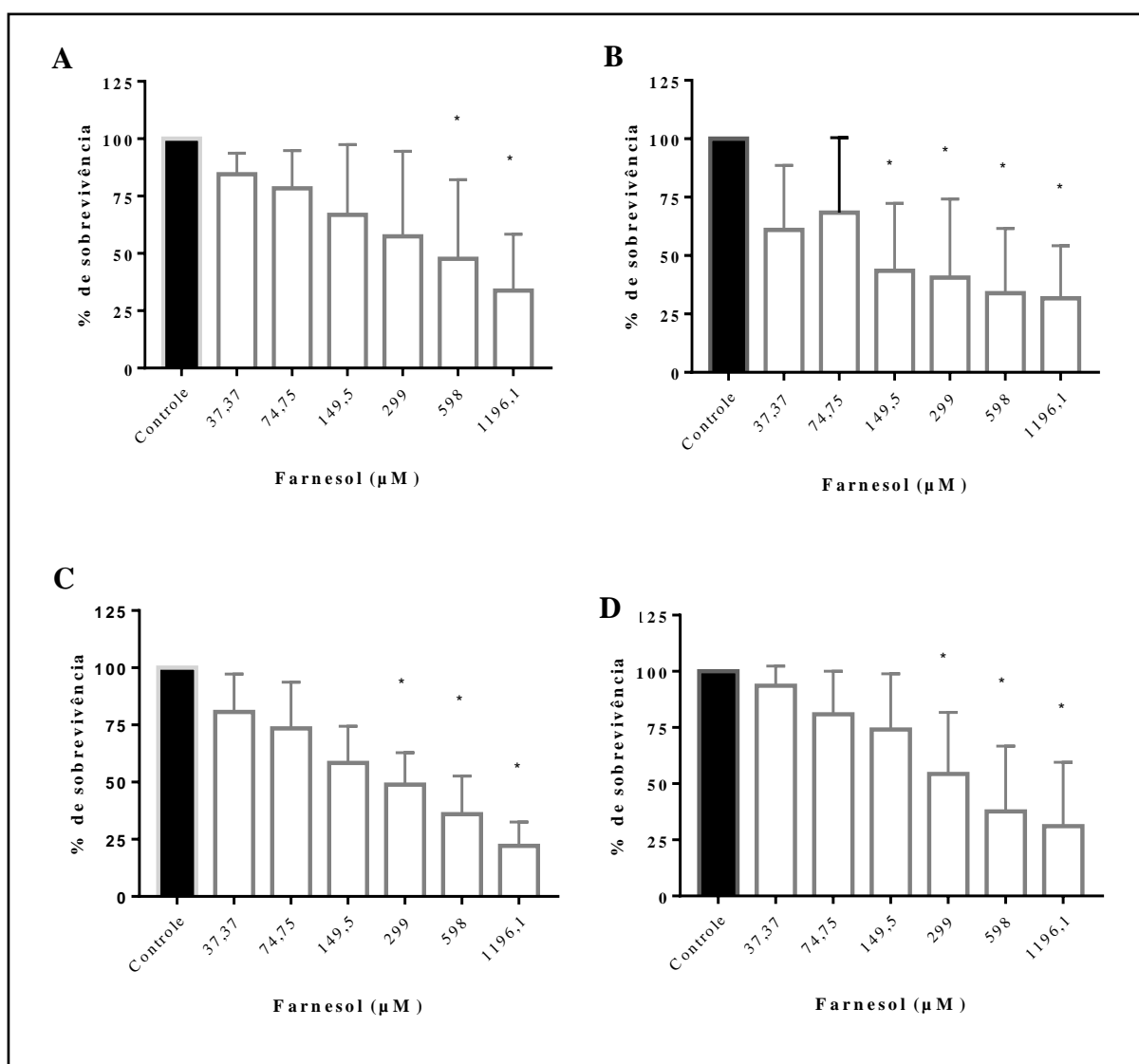


Figura 8: Redução de biofilmes de cepas de *T. asahii* (n=3) e *T. inkin* (n=7) na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 37,37 a 1196,1 μM após o biofilme já maduro e controles sem farnesol (barras pretas). (A e C) Atividade metabólica pelo ensaio de redução de XTT de cepas de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente. (B e D) Biomassa por coloração com cristal violeta de cepas de *T. asahii* e *T. inkin*. Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle ($p > 0,05$).

6.4.4 Atividade proteolítica em crescimento planctônico e em biofilme

Mesmo em concentrações abaixo do CIM, o farnesol foi capaz de diminuir a atividade proteolítica das cepas de *T. asahii* e *T. inkin* em crescimento planctônico. Porém, na análise do crescimento em biofilme, farnesol aumentou a atividade proteolítica, com pico de expressão na concentração de 18,68 μM , nas primeiras 24 h e se manteve constante após 48 h de crescimento, quando o biofilme está maduro.

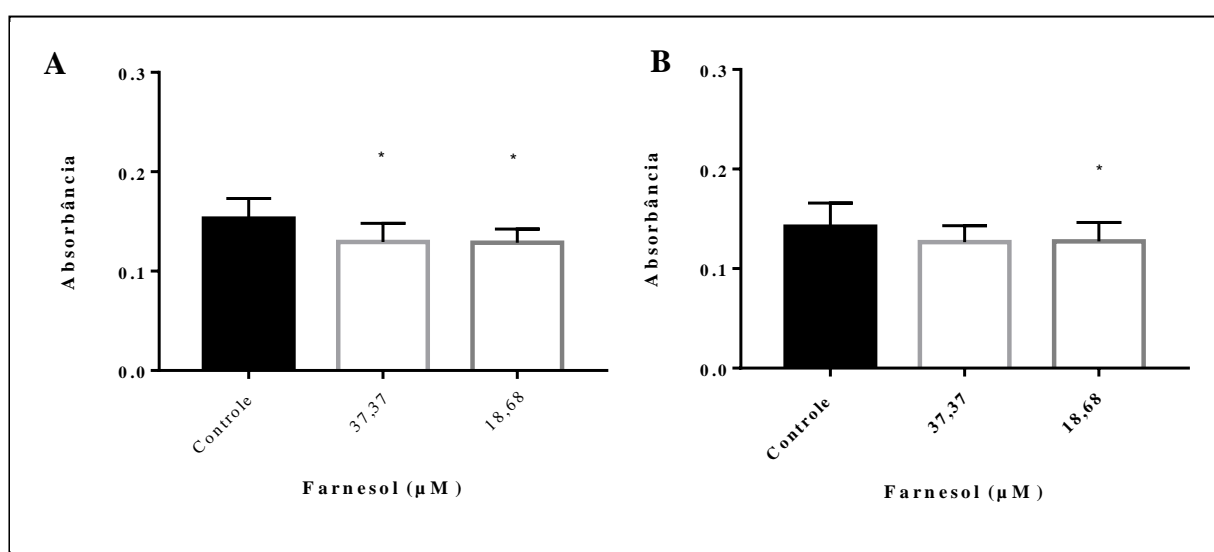


Figura 9: Redução da produção de protease em crescimento planctônico (A) *T. asahii* (n=3) e (B) *T. inkin* (n=7) na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 18,68 e 37,37 μM .

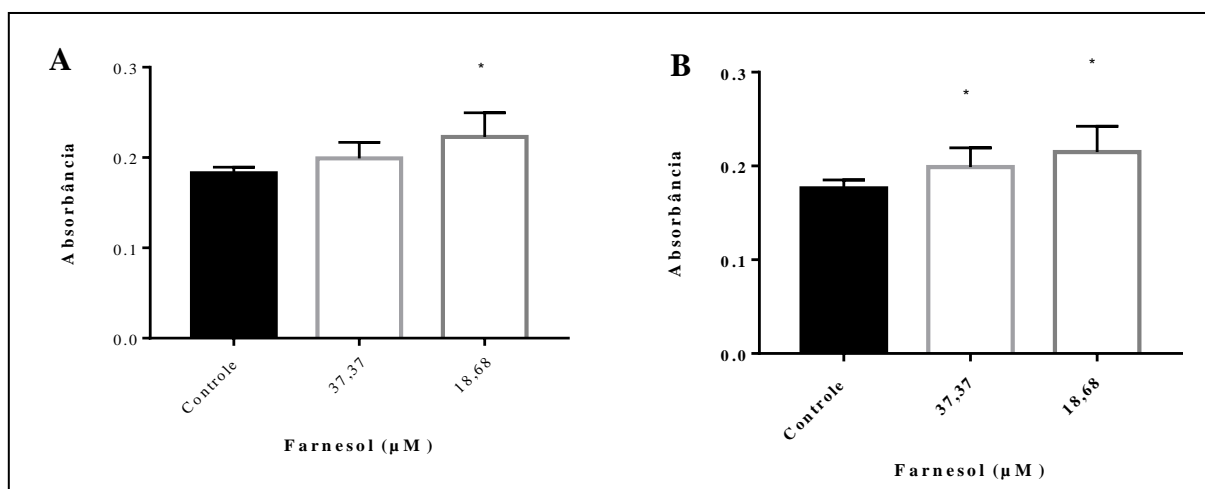


Figura 10: Quantificação da produção de protease em biofilme (A) *T. asahii* (n=3) e (B) *T. inkin* (n=7) após 24h de crescimento na presença de farnesol (barras brancas) nas concentrações de 18,68 e 37,37 µM.

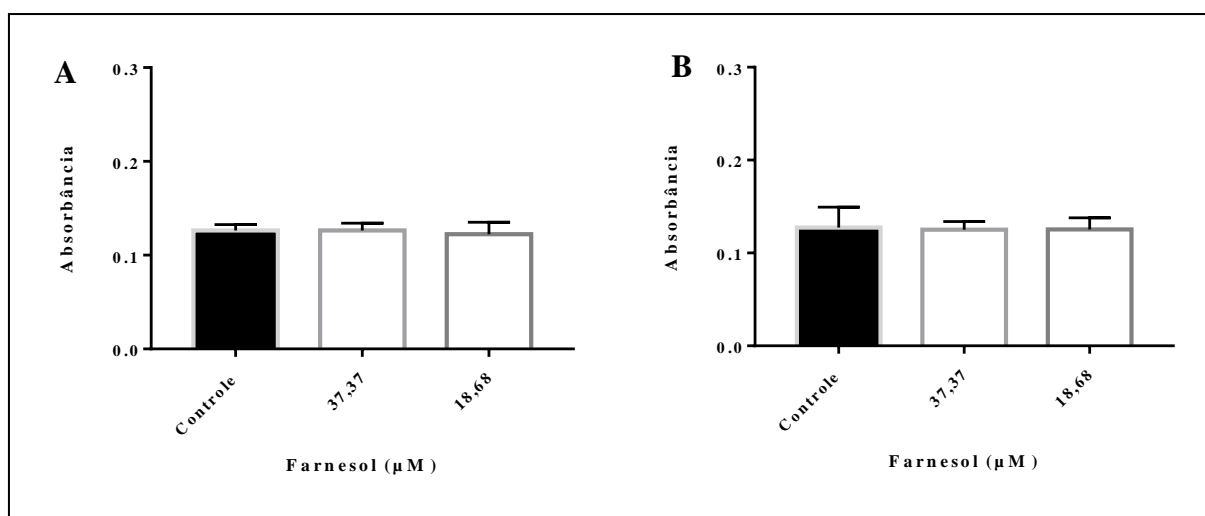


Figura 11: Quantificação da produção de protease em biofilme (A) *T. asahii* (n=3) e (B) *T. inkin* (n=7), no qual não sofreu alteração após 48h de crescimento na presença de farnesol (barras brancas) em concentrações de 18,68 e 37,37 µM.

6.4.5 Morfologia e estrutura dos biofilmes

6.4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura do desenvolvimento do biofilme de *T. asahii* CEMM 05-6-072, observou-se que o farnesol na concentração de 598 μM reduziu o processo de adesão celular, reduzindo o desenvolvimento das hifas em comparação com o controle livre de farnesol (Figura 12A e 12B). Durante o desenvolvimento do biofilme, o farnesol, na mesma concentração, modificou a estrutura das hifas, bem como reduziu o crescimento celular, como mostrado na Figura 12C e 12D. Quando adicionado 598 μM de farnesol após o biofilme já maduro, bem estruturado, observou-se que o composto foi capaz de desestruturar os canais de passagem de água, reduzindo as hifas e a matriz extracelular.

Ao longo do desenvolvimento do biofilme de *T. inkin* CEMM 05-6-074, observou-se que, nas primeiras seis horas de incubação com o farnesol na concentração de 598 μM , a adesão celular foi reduzida em comparação com o controle livre do composto, não evidenciando a formação de hifas (Figura 13A e 13B). O farnesol também alterou a estrutura do biofilme, mesmo quando a sua adição às células ocorreu depois do período de adesão (Figura 13C e 13D). Após atingir o estágio de maturidade, o farnesol desestabilizou a ultraestrutura morfológica do biofilme, como pode ser detectado pela ausência de densas massas celulares, canais de circulação de água e matriz exopolimérica (Figura 13D e 13E).

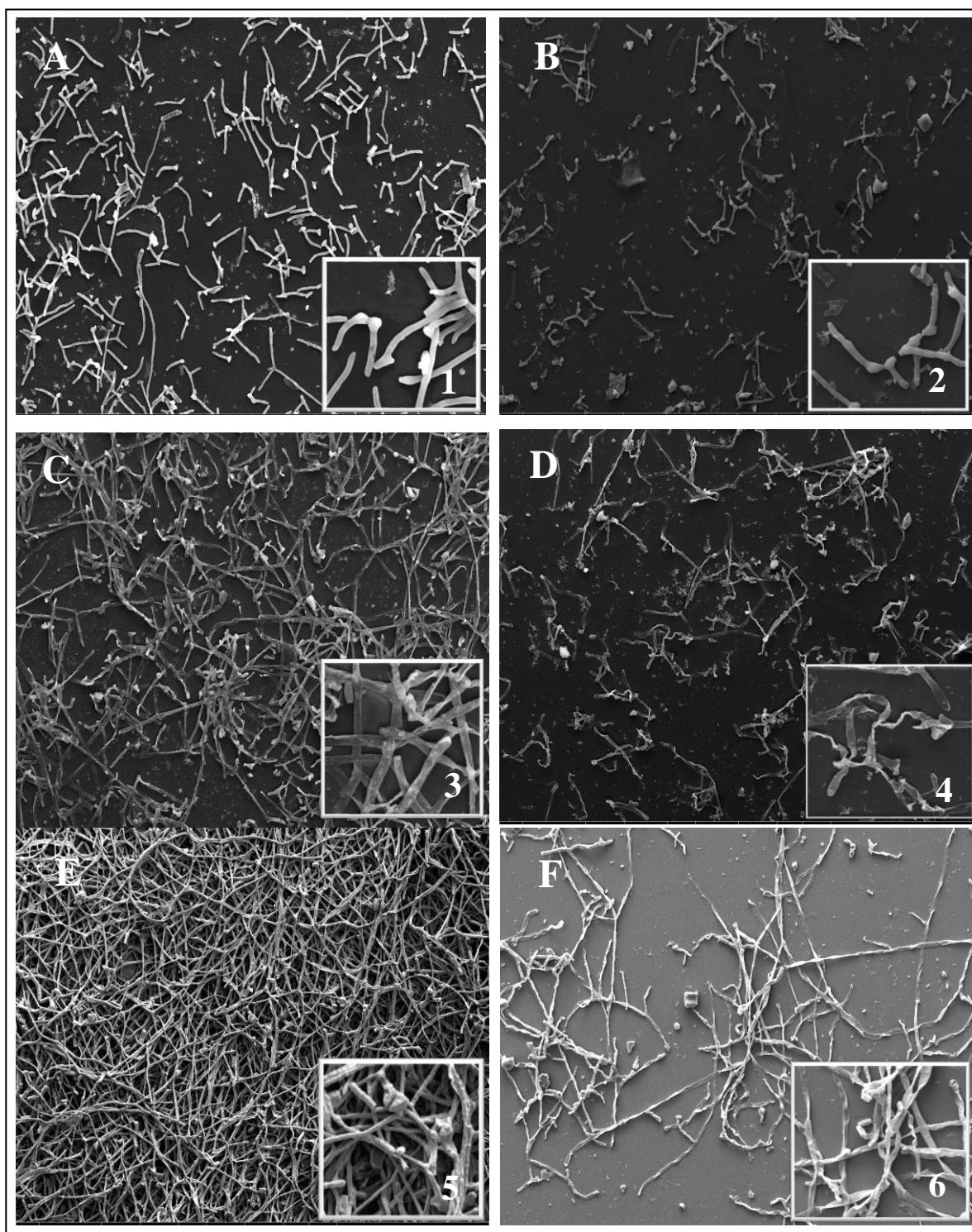


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura da Morfologia e ultraestrutura de biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 após o tratamento com farnesol na concentração de 598 μM durante a adesão celular (B), desenvolvimento do biofilme (D) e biofilme maduro (F), comparado com os respectivos controles de cada tratamento (A, C e E). Magnitude: 1000x. Barra: 100 μm . As imagens 1, 2, 3, 4, 5 e 6 evidenciam estrutura com magnitude 3000x e barra de 30 μm .

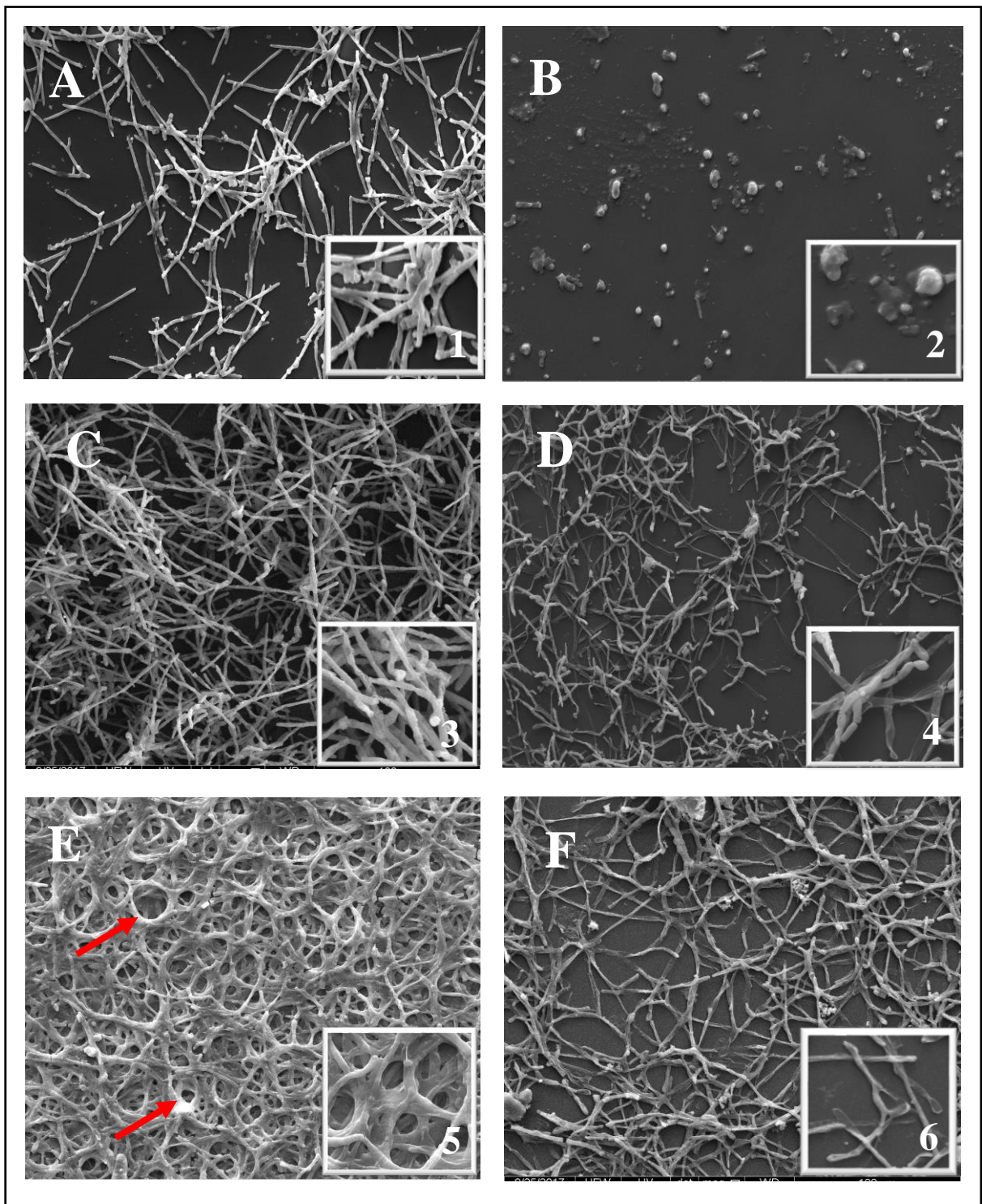


Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura da Morfologia e ultraestrutura de biofilmes de *T. inkin* CEMM 05-6-074 após o tratamento com farnesol na concentração de 598 μM durante a adesão celular (B), desenvolvimento do biofilme (D) e biofilme maduro (F), comparado com os respectivos controles de cada tratamento (A, C e E). As setas vermelhas indicam os canais de passagem de água. Magnitude: 1000x. Barra: 100 μm . As imagens 1, 2, 3, 4, 5 e 6 evidenciam estruturas com magnitude 3000x e barra de 30 μm .

6.4.5.2 Microscopia confocal a laser

Nas imagens de microscopia confocal a laser do desenvolvimento do biofilme de *T. asahii* CEMM 05-6-072, foi possível observar que na concentração de 598 μM o farnesol é capaz de inviabilizar as células no processo de adesão, sendo vista muitas células mortas (Figura 14A e 14B). Já a ação do farnesol no processo de desenvolvimento, tanto inibiu a robustez do biofilme quanto observa-se células inviáveis, as hifas apresentam-se mais soltas (Figura 14C e 14D). Adicionando-se farnesol na concentração de 598 μM após o biofilme já maduro observa-se que tem muitas células mortas e as hifas desestruturadas, sendo capaz de desestabilizar a ultraestrutura de um biofilme bem formado como visto no seu respectivo controle (Figura 14E e 14F).

Já para os biofilmes de *T. inkin* CEMM 05-6-074, foi possível observar que o farnesol na concentração de 598 μM foi capaz de inibir o processo de adesão das células, visto pela presença de poucas células verdes aderidas em comparação ao seu respectivo controle (Figura 15A e 15B). Adicionando o farnesol durante o processo de desenvolvimento do biofilme, verificamos que a espessura do biofilme esteja mais aumentada, percebe-se que as hifas estão soltas e desestruturadas, soltando da malha de sustentação formada pela matriz exopolissacarídica (Figura 15C e 15D). Após adicionar o farnesol no biofilme já maduro, a concentração de farnesol de 598 μM tanto reduziu a espessura do biofilme como foi capaz de matar as células em comparação ao seu respectivo controle (Figura 15E e 15F).

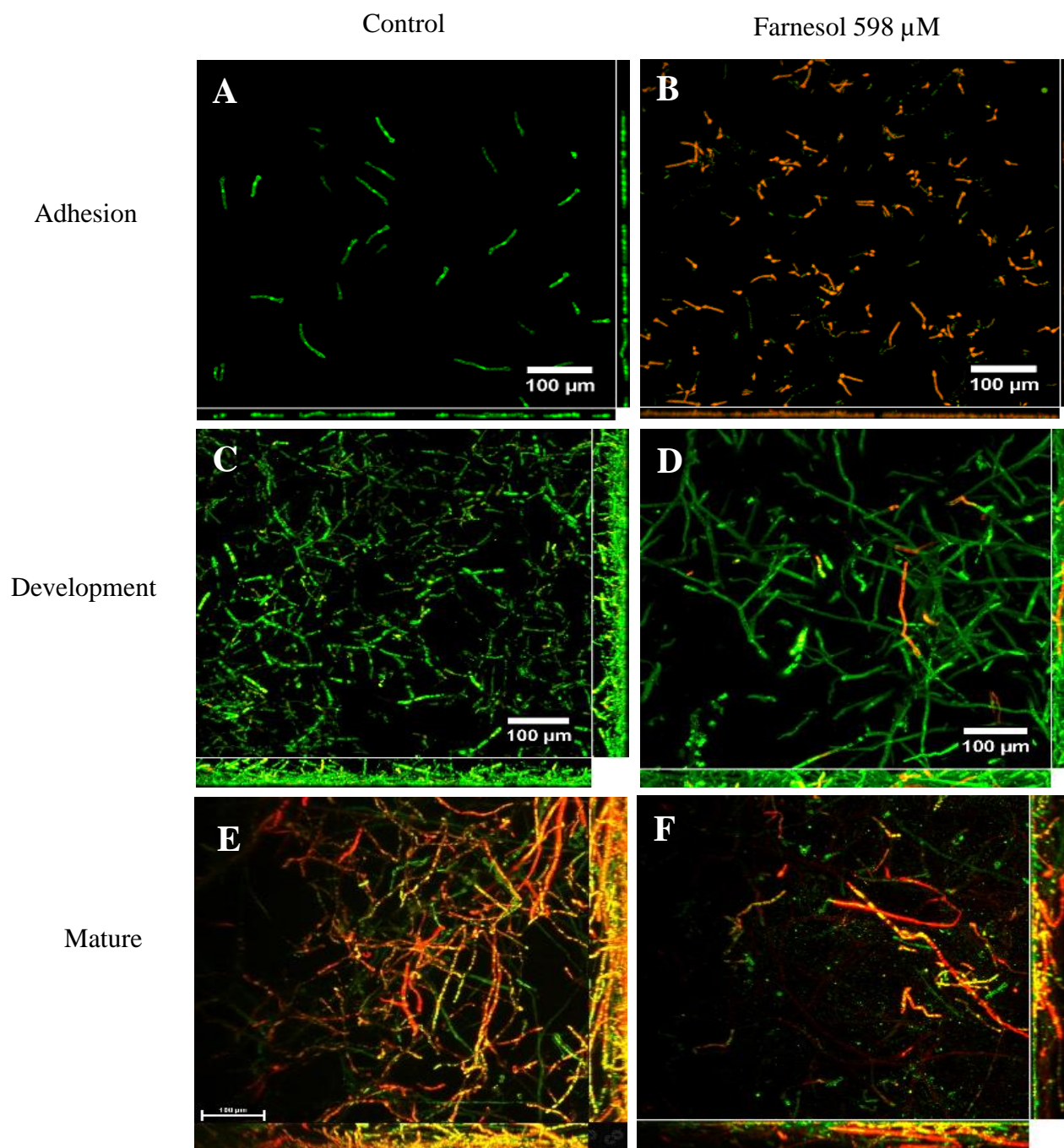
Trichosporon asahii

Figura 14: Microscopia confocal de varredura a laser e ultraestrutura de biofilmes de *T. asahii* CEMM 05-6-072 após o tratamento com farnesol na concentração de 598 μ M durante a adesão celular (B), desenvolvimento do biofilme (D) e biofilme maduro (F), comparado com os respectivos controles de cada tratamento (A, C e E). Magnitude: 1000x. Barra: 100 μ m.

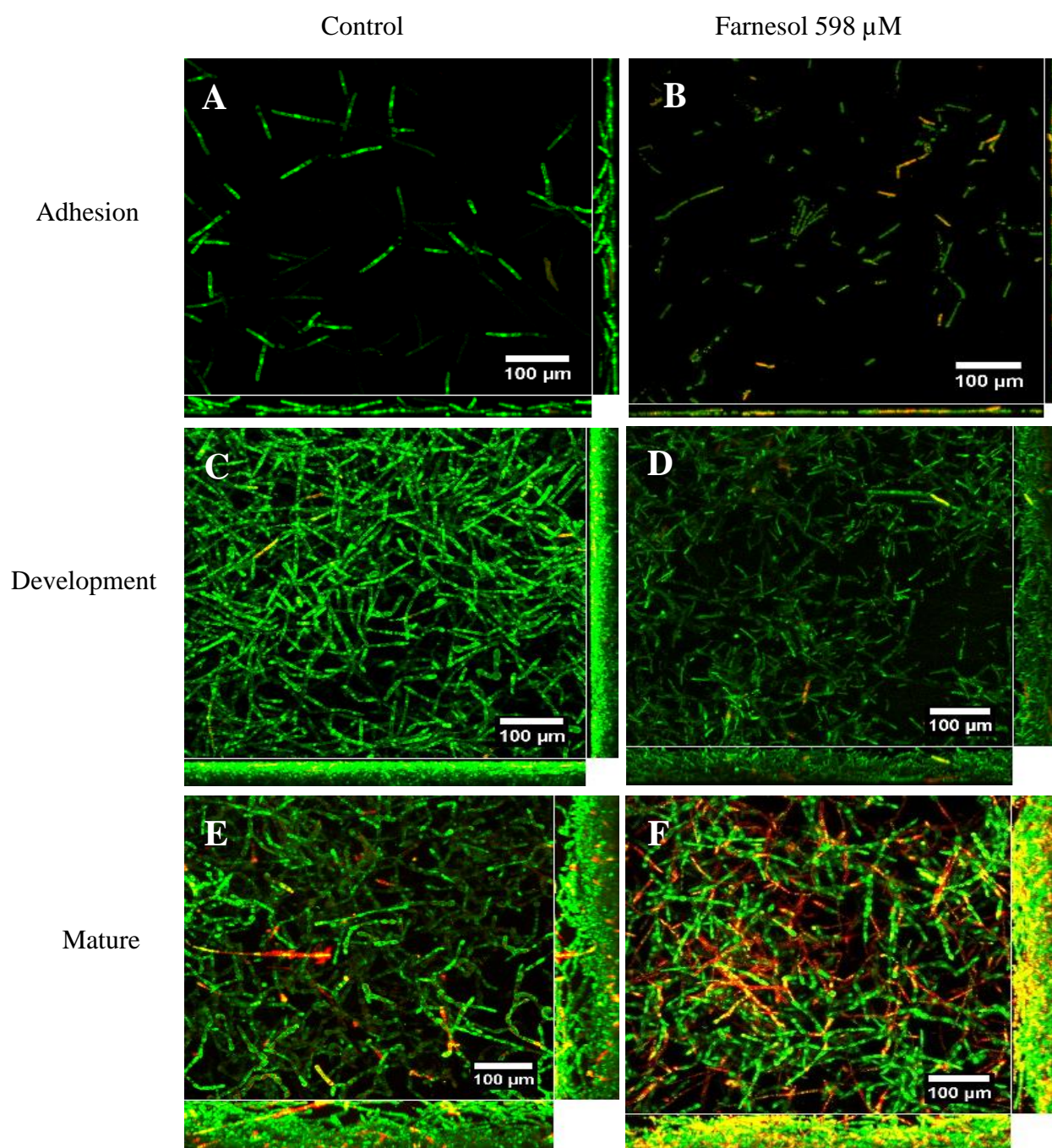
Trichosporon inkin

Figura 15: Microscopia confocal de varredura a laser e ultraestrutura de biofilmes de *T. inkin* CEMM 05-6-074 após o tratamento com farnesol na concentração de 598 μM durante a adesão celular (B), desenvolvimento do biofilme (D) e biofilme maduro (F), comparado com os respectivos controles de cada tratamento (A, C e E). Magnitude: 1000x. Barra: 100μm.

7 DISCUSSÃO

Infecções fúngicas hospitalares causadas por *Trichosporon* spp. estão cada vez mais recorrentes nos últimos anos, principalmente, em pacientes com debilidade imunológica como: portadores de HIV, câncer, doenças hematológicas graves (BENTUBO et al., 2014; TAVERNA et al., 2014; ESCARRÁ et al., 2017). Estas são responsáveis por um índice de morte de até 80%, nesses pacientes, tendo o uso de catéteres a principal porta de entrada para a infecção (MARINÉ et al., 2015). O quadro infeccioso se agrava pela capacidade de *Trichosporon* spp. de formar biofilmes, dificultando assim, o tratamento com os antifúngicos de uso comum na clínica (DI BONAVENTURA et al., 2006; RAMAGE et al., 2012; FERNANDES et al., 2016). Apesar da introdução de novos fármacos, nos últimos anos, a eficácia do tratamento ainda permanece insatisfatória, tanto pelo baixo espectro da atividade antifúngica quanto pela toxicidade para as células do hospedeiro (PIERCE et al., 2013). Dado esses fatos, esse estudo teve como objetivo avaliar a ação do composto farnesol como agente inibidor de crescimento de cepas de *T. asahii* e *T. inkin* em crescimento planctônico e em biofilme.

Nesse contexto, o interesse de estudar a atividade antimicrobiana de outros compostos, aumentou nos últimos anos. Diversos estudos têm mostrado a importância do farnesol como potencial agente antimicrobiano (JABRA-RIZK et al., 2006a; DERENGOWSKI et al., 2009; BRILHANTE et al., 2013; FERNANDES et al., 2016; EGBE et al., 2017). O farnesol é um álcool sesquiterpeno gerado endogenamente por células de *Candida albicans* pela desfosforilação enzimática de farnesil difosfato, uma molécula precursora da síntese de esteróis (HORNBY et al., 2001). A literatura relata diversos estudos descrevendo a atividade antimicrobiana de farnesol frente a bactérias como *Burkholderia pseudomallei* e *Staphylococcus* spp, assim como para alguns fungos como *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Cryptococcus neoformans*. (DERENGOWSKI et al., 2009; CERCA et al., 2012; CORDEIRO et al., 2012; CASTELO-BRANCO et al., 2015; FERNANDES et al., 2016). Nesse estudo, pela primeira vez, foi investigada a atividade antifúngica do farnesol contra fungos do gênero *Trichosporon*, agente causador de tricosporonose.

Os valores de CIM *in vitro* obtidos para crescimento planctônico, mostraram que todas as cepas testadas de *Trichosporon* spp. tiveram o crescimento inibido em até 80% após a adição do farnesol ao meio de cultura, em concentrações que variaram de 74,75 a 598 μ M.

Dados na literatura mostram que são diferentes as condições experimentais que podem influenciar na toxicidade do composto farnesol sobre células de *Candida* spp. (WEBER; SCHULZ; RUHNKE, 2010), mas ainda não estão bem descritos os mecanismos de ação do farnesol, porém, alguns estudos acreditam que o farnesol age na produção de ergosterol da membrana (JABRA-RIZK et al., 2006; DERENGOWSKI et al., 2009). Posteriormente, em um estudo recente feito por Egbe et al. (2017), observou-se que o farnesol reduziu a síntese proteica nos primeiros estágios de crescimento de *C. albicans*, assim como inibiu o processo inicial de tradução.

Também foi avaliado o efeito do farnesol associado a drogas antifúngicas sobre a inibição de crescimento planctônico de *T. asahii* e *T. inkin*. Assim, observamos que em concentrações sub-inibitórias de farnesol com as drogas testadas não houve redução significativa do crescimento fúngico, caracterizando efeito indiferente das associações testadas. Os dados obtidos confrontam com os relatados para outros fungos como *Candida* spp., *Coccidioides posadasii*, os quais foram observados sinergismo entre farnesol e as drogas testadas (BRILHANTE et al., 2013; CORDEIRO et al., 2016). Porém, nossos resultados sugerem que as cepas de *T. asahii* e *T. inkin*, por serem pertencentes ao filo Basidiomycota e assim possuem mecanismos de virulência diferentes dos fungos Ascomycotas citados acima, como a presença de GXM na parede das células fúngicas e produção de melanina, além do dimorfismo celular (COLOMBO et al., 2011; CARVALHO et al., 2014), conferindo maior proteção à célula fúngica.

Trichosporon spp. são fungos pleomórficos, nos quais a capacidade de alterar os blastoconídios em hifas é fator importante para a patogenicidade (COLOMBO et al., 2011). Ao fazermos o microcultivo de *T. asahii* e *T. inkin* em meio sólido contendo concentrações de farnesol de 598 e 1196,1 μM , observou-se que o farnesol impede a formação de hifas de *T. asahii* e *T. inkin* de maneira dose-dependente. Na maior concentração a forma de levedura foi prevalente, não observando hifas, em comparação com o controle livre do composto. Corroborando com os achados descritos para *C. albicans*, onde a inibição da filamentação se deu pelo suprimento da formação do tubo germinativo, sem influenciar na taxa de crescimento celular (HORNBY et al., 2001; EGBE et al., 2017).

Nos últimos anos, observou-se que as infecções fúngicas hospitalares causadas por *Trichosporon* estão fortemente correlacionadas com a formação de biofilmes em cateteres, associada à alta mortalidade em pacientes imunodeprimidos (DI BONAVENTURA et al., 2006; CORDEIRO et al., 2015; XIA et al., 2017). Assim, nosso estudo, pioneiro na utilização

da molécula de farnesol para inibição do crescimento de biofilme de *Trichosporon* spp. se justifica pelo farnesol diminuir a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes nos diferentes estágios de desenvolvimento, enaltecendo a elevada atividade contra biofilmes já descrito para espécies de *Candida* (JABRA-RIZK et al., 2006; FERNANDES et al., 2016).

Durante a avaliação do efeito do farnesol frente as cepas de *Trichosporon* spp, observamos que o farnesol teve maior ação inibitória em biofilmes, pois concentrações a baixo da CIM para células planctônicas foram capazes de inibir os estágios de desenvolvimento de comunidades sésseis, como mostrado no estágio de adesão, que é o momento nos quais as células irão se fixar na superfície para crescerem em comunidade, o farnesol impediu a adesão de muitas células e dificultou o desenvolvimento das células que conseguiram se aderir a superfície. Tal resultado pode ser pelo fato da redução de filamentação e do mecanismo de tradução observado por Egbe et al. (2017) para cepas de *Candida albicans*.

A adição do farnesol durante o desenvolvimento do biofilme impediu a formação de um biofilme robusto, espesso e envoltos por matriz extracelular, das cepas de *Trichosporon* spp. como já relatado por Cordeiro et al., (2015), tendo redução de biomassa e da atividade metabólica.

Após o biofilme formado, com as estruturas bem formadas e maduras, a adição do farnesol reduziu a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes, evidenciada pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura expressadas pelas Figuras 12F e 13F, diferente do observado no estudo de Cordeiro et al. (2015) que relatou um biofilme espesso com muitas estruturas. Afirmando que o farnesol apresenta uma boa ação na redução de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.

Além da formação de hifas e da capacidade de formar biofilme, um dos fatores de virulência importantes no gênero *Trichosporon* é a produção de enzimas hidrolíticas, como proteases. Desse modo, ao expor as cepas de *Trichosporon* as concentrações sub-inibitórias de farnesol observamos redução do catabolismo de proteínas na menor concentração testada para crescimento planctônico, corroborando com os estudos feitos por Enjalbert & Whiteway (2005) os quais mostraram que a exposição de *C. albicans* ao farnesol induziu a expressão de genes relacionados ao catabolismo proteico.

Durante o cultivo em biofilme de 24 h, as concentrações de farnesol aumentou a atividade proteolítica na menor concentração, correlacionando os achados de Cordeiro et al. (2015) que relatou o aumento da atividade proteolítica quando em biofilmes. Entretanto, em cultivo de 48h a atividade proteásica se manteve, sugerindo que o fungo produza o fator de virulência para tentar minimizar a ação da droga.

Por fim, a análise de sensibilidade das cepas de *T. asahii* e *T. inkin*, em crescimento planctônico e em biofilme, frente ao farnesol apresentou resultados promissores na busca de novos agentes com propriedades antifúngicas para os mesmos. Assim, esse trabalho traz novas perspectivas para a realização de estudos *in vivo* que possam elucidar a ação do farnesol em células hospedeiras.

8 CONCLUSÃO

- O farnesol exibiu efeito inibitório, *in vitro*, em crescimento planctônico contra as três cepas de *T. asahii* e as sete cepas de *T. inkin*.
- O farnesol foi capaz de inibir a conversão de blastoconídios para hifas para as duas espécies testadas.
- A adesão inicial das células a superfície foi reduzida pela ação do farnesol, sendo que *T. asahii* foi afetado com menor concentração do composto.
- O desenvolvimento do biofilme foi reduzido, em comparação com o controle livre do composto, para todas as cepas, sendo que *T. asahii* apresentou redução em uma concentração de farnesol menor do que *T. inkin*.
- A adição do farnesol ao biofilme maduro desestabilizou a robustez e a biomassa dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, evidenciados pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal
- A produção de protease em crescimento planctônico foi inibida em concentrações abaixo do CIM, porém foi aumentada em crescimento sésil para ambas as espécies.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1629, 2016.
- ALVIANO, D. S.; FRANZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 229–237, 2004.
- ARAÚJO, I. R. M.; MARQUES, S. G.; Tricosporonoses: etiologia, manifestações clínicas, diagnósticos laboratoriais, epidemiologia e tratamento. **CONNEPI**, 2010.
- BANDARA, H. M. H. N.; LAM, O. L. T.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. Microbial chemical signaling: a current perspective. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 217-249, 2012.
- BENTUBO, H. D. L.; GAMBALE, W.; FISCHMAN, O. Caracterização laboratorial e comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 15, n.1, p. 69-74, 2013.
- 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*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 377-387, 2014.
- BRILHANTE, R. S. N.; VALENTE, L. G. A.; ROCHA, M. F. G.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; LIMA, R. A. C.; LEITE, J. J. G.; RIBEIRO, J. F.; PEREIRA, J. P.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C. Sesquiterpene Farnesol Contributes to Increased Susceptibility to β -Lactams in Strains of *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2198-2200, 2012.
- BRILHANTE, R. S. N.; LIMA, R. A. C.; CAETANO, E. P.; LEITE, J. J. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; RIBEIRO, J. F.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Effect of Farnesol on Growth, Ergosterol Biosynthesis, and Cell Permeability in *Coccidioides posadasii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2167-2170, 2013.
- BRILHANTE, R. S. N.; ESPAÑA, J. D. A.; DE ALENCAR, L. P.; PEREIRA, V. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PEREIRA-NETO, W. A.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato*. **Mycoses**, p. 1-6, 2017.
- CARVALHO, A. M. R.; MELO, L. R. B.; VERAS, L. M.; NEVES, R. P. Invasive *Trichosporon cutaneum* infection in an infant with wilms' tumor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 59-60, 2007.
- CARVALHO, M. H. G. F.; SANTOS, F. B.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA-PAES, R. L-dihydroxyphenylalanine induces melanina production by members of the genus *Trichosporon*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 6, p. 988-991, 2014.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; RIELLO, G. B.; VASCONCELOS, D. C.; GUEDES, G. M. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M; F; G.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **Journal Applied Microbiology**, v. 120, p. 600-606, 2015.

CERCA, NUNO; GOMES, FERNANDA; PEREIRA, SOFIA; TEIXEIRA, PILAR; OLIVEIRA, ROSÁRIO. Confocal laser scanning microscopy analysis of *S. epidermidis* biofilms exposed to farnesol, vancomycin and rifampicin. **BioMed Central**, v. 5 n. 244, p. 1-7, 2012.

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

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

CHOW, B. D. W.; LINDEN, J. R.; BLISS, J. M. *Candida parapsilosis* and the neonate: epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 935-946, 2012.

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. 23-30, 2007.

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

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

CORDEIRO, R. A.; NOGUEIRA, G. C.; BRILHANTE, R. S. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; MOURÃO, C. I.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PAIVA, M. A. N.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Farnesol inhibits *in vitro* growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related exoenzymes. **Veterinary Microbiology**, v. 159, p., 375-380, 2012.

CORDEIRO, R. A.; TEIXEIRA, C. E. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PAIVA, M. A. N.; GIFFONI LEITE, J. J.; LIMA, D. T.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. **Medical Mycology**, v. 51, p. 53-59, 2013.

CORDEIRO, R.A.; SERPA, R.; ALEXANDRE, C.F.U.; MARQUES, F.J.F.; MELO, C.V.S.; FRANCO, J.S.; EVANGELISTA, A.J.J.; CAMARGO, Z.P.; BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA, M.F.G.; MOREIRA, J.L.B.; BANDEIRA, T.J.P.G; SIDRIM, J.J.C. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 159, p. 1-10, 2015.

CORDEIRO, R. A.; 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. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 309-317, 2016.

CORDEIRO, R. A.; SERPA, R.; MENDES, P. B. L.; EVANGELISTA, A. J. J.; ANDRADE, A. R. C.; FRANCO, J. S.; PEREIRA, V. S.; ALENCAR, L. P.; OLIVEIRA, J. S.; CAMARGO, Z. P.; NETO, R. G. L.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. **Biofouling**, v. 33, n. 8, p. 640-650, 2017.

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

DERENGOWSKI, L. S.; SILVA, C. S.; BRAZ, S. V.; DE SOUSA, T. M. M.; BÁO, S. N.; KYAW, C. M.; PEREIRA, I. S. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 8, n. 13, 2009.

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3269-3276, 2006.

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

EGBE, N. E.; DORNELLES, T. O.; PAGET, C. M.; CASTELLI, L. M.; ASHE, M. P.; Farnesol inhibits translation to limit growth and filamentation in *C. albicans* and *S. cerevisiae*. **Microbial cell**, v. 04, nº 09, p. 294-304, 2017.

ESCARRÁ, F.; LEMA, J.; CARACCILO, B.; CARNOVALE, S.; ÁLVAREZ, V.; TRAMONTI, N.; GUARRACIANO, F.; ROSANOVA, M. T. *Trichosporon asahii* sepsis

associated with urinary catheter in a pediatric burn unit: 2 case reports. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 115, n. 5, p. 311-314, 2017.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAEUER, S.; NICHTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W.; HUBE, B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3689–3700, 2002.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FERNANDES, R. A.; MONTEIRO, D. R.; ARIAS, L. S.; FERNANDES, G. L.; DELBEM, A. C. B.; BARBOSA, D. B. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. **The journal of Bioadhesion and Biofilm research**. v. 32, n. 3, p. 329-338, 2016.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D.; DÍEZ, S.; YOUNGCHIM, S.; AISEN, P.; CANO, L. E.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5760–5767, 2001.

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

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

HORNBY, J.M., JENSEN, E.C., LISEC, A.D., TASTO, J.J., JAHNKE, B., SHOEMAKER, R., DUSSAULT, P., NICKERSON, K.W.. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982–2992, 2001.

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*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 4, p. 237-242, 2004.

ITURRIETA-GONZALEZ, I.; 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.; MEILLER, T. F.; JAMES, C. E.; SHIRTLIFF, M. E. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. **Antimicrobial Agents Chemother**; v. 50, n. 4, p. 1463-9, 2006a.

JABRA-RIZK, M. A.; SHIRTLIFF, M.; JAMES, C.; MEILLER, T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 6, n. 7, p. 1063-1073, 2006b.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

KHAN, M. I. D.; SAHNI, B. A. K.; BASU, C. A. HALEEM, S. *Trichosporon asahii* urinary tract infection in immunocompetent patients. **Medical Journal Armed Forces India**. v. 71, n. 4, p. 373-376, 2015.

KUETE, V.; EFFERTH, T.; Molecular determinants of cancer cell sensitivity and resistance towards the sesquiterpene farnesol. **Pharmazie**, v. 68, n° 7, p. 608-615, 2013.

KURODA, M.; NAGASAKI, S.; OHTA, T. Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the C55 lipid carrier of the murein monomer precursor contributing to increased susceptibility to β -lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 425-432, 2007.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 7, p. 1-11, 2010.

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

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilm to Antifungal Agents *In Vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 3, p. 1021 – 1033, 2006.

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

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

MORAIS-BRAGA, M.F.B.; CARNEIRO, J.N.P.; MACHADO, A. J. T.; SALES, D. L.; SANTOS, A. T. L.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MENEZES, I. R. A.; SOUZA, D. S. L.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn: Antifungal activity or inhibition of virulence? **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 24, n. 2, p. 302-313, 2017.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B. L.; AISEN, P.; HAY, R. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* *in vitro* and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4026-4033, 2003.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Elsevier editora, São Paulo, Cap. 69, p. 693-703, 2006.

NETO, T. C. C. **Caracterização microbiológica de isolados clínicos de *Trichosporon* spp.** 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2007.

NOSANCHUK, J. D.; GÓMEZ, B. L.; YOUNGCHIM, S.; DÍEZ, S.; AISEN, P.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J.. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5124–5131, 2002.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OKSHEVSKY, M.; MEYER, R. L. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 341-351, 2015.

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

PIERCE, C. G.; SRINIVASAN, A.; UPPULURI, P.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 726-730, 2013.

POSTERARO, B.; TORELLI, R.; CAROLIS, E. D.; POSTERARO, P.; SANGUINETTI, M. Antifungal susceptibility testing: Current role from the clinical laboratory perspective. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. e2014030, 2014.

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

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

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

SILVA, C. M. S. **Efeito do farnesol, uma molécula do Quorum Sensing de *Candida albicans*, em diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*.** 2009, 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

SILVESTRE JUNIOR, A. M. **Sistemática molecular de *Trichosporon* spp. baseada em genes ribossomais e sua correlação com fatores de virulência e epidemiologia.** 2009. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

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. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 628-634, 2010.

SUGITA, T.; ICHIKAWA, T.; MATSUKURA, M.; SUEDA, M.; TAKASHIMA, M.; IKEDA, R.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. Genetic Diversity and Biochemical Characteristics of *Trichosporon asahii* Isolated from Clinical Specimens, Houses of Patients with Summer-Type-Hypersensitivity Pneumonitis, and Environmental Materials. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2405-2411, 2001.

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. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 1750-1757, 2012.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M.F.N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 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. **Medical Mycology**, v. 52, n. 4, p. 356-366, 2014.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégia de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-138, 2013.

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 Pathogens**, v. 6, n. 3, p. 1-13, 2010.

VAZQUEZ, J. A. *Trichosporon* Infection. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 1, p. 52-58, 2010.

VÁSQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTÍZ, A. M.; HUNDEIKER, M.; BONIFAZ, A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 11, n. 5, p. 381-393, 2013.

WEBER, K.; SCHULZ, B.; RUHNKE, M. The quorum-sensing molecule E,E-farnesol-its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. **Yeast**, v. 27, n° 9, p. 727-739, 2010.

WU, J; XI, C. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 16, p. 5390-5395, 2009.

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.; HATFIEL, R. D.; NTAMBI, J. M.; NETT, J. E.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01333-14, 2014.