



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

ANA LUIZA RIBEIRO AGUIAR

**EFEITO DO BUTIRATO DE SÓDIO SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
SÉSSEIS DE *Trichosporon asahii* E *T. inkin***

FORTALEZA-CE

2018

ANA LUIZA RIBEIRO AGUIAR

Efeito do butirato de sódio sobre células planctônicas e sésseis 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.

Área de concentração: Ciências Biológicas III.
Linha de pesquisa: Resistência a antimicrobianos.

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)

- A227e Aguiar, Ana Luiza Ribeiro.
Efeito do butirato de sódio sobre células planctônicas e sésseis de *Trichosporon asahii* e *T. inkin* / Ana Luiza Ribeiro Aguiar. – 2018.
83 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profª. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.
1. *Trichosporon asahii*. 2. *Trichosporon inkin*. 3. biofilmes. 4. butirato de sódio. I. Título.
- CDD 616.9
-

ANA LUIZA RIBEIRO AGUIAR

**EFEITO DO BUTIRATO DE SÓDIO SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
SÉSSEIS 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.

Área de concentração: Ciências Biológicas III.

Linha de pesquisa: Resistência a antimicrobianos.

Aprovada em: 10/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.Dr^a. Débora Castelo-Branco de Souza Collares Maia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Dr. Jonathas Sales de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, por me dar forças para superar as
dificuldades e alcançar meus objetivos.
À minha mãe, Maria de Nasaré Ribeiro, por
ser minha base e fortaleza.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença em todos os momentos da minha vida e por ter me dado força e coragem para continuar nessa caminhada.

À minha mãe Nasaré, por todo apoio, amor e dedicação depositados em mim, incondicionalmente, durante toda a minha vida. À minha mãe Christianne, por ter me gerado, por ser minha amiga e me apoiar quando preciso.

Ao meu noivo Glailton Robson, por ser meu companheiro de todos os dias, por compartilhar sonhos comigo, por ser paciente nas horas necessárias e por me ensinar, de forma tão espontânea e natural, a ser uma pessoa melhor.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, por me acolher em seu laboratório, por acreditar em mim, por repassar seus ensinamentos e me ajudar na concretização deste projeto. Além de orientadora, é uma inspiração.

Aos demais professores sempre presentes no Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM – da Universidade Federal do Ceará: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, Prof^a. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, por contribuírem com seus ensinamentos para meu crescimento acadêmico e profissional.

Às professoras convidadas a compor a banca de qualificação: Profa. Dr^a. Francisca Jakelyne de Farias Marques e Profa. Dr^a. Erika Helena Salles de Brito, por contribuir significativamente com suas sugestões para o engrandecimento desse trabalho.

À Prof^a. Dra. Débora Castelo-Branco, ao Prof. Dr. Edson Holanda e ao Dr. Jonathas Sales de Oliveira, pela disponibilidade e paciência em dedicarem seu tempo e energia ao meu trabalho e por participarem da minha banca, fornecendo grandes contribuições.

À Prof^a. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira, por todos os ensinamentos repassados durante minha graduação e por me incentivar a seguir na pesquisa e na área acadêmica, apresentando-me ao universo apaixonante da Microbiologia.

Aos meus colegas integrantes do CEMM, os quais conheci durante a pós-graduação e com os quais convivi nesses dois anos, em especial ao Vandbergue Santos, por toda a ajuda

disponibilizada durante as diversas etapas desse estudo, bem como pelos conselhos e palavras de incentivo, além de um colega de pós-graduação, tornou-se um grande amigo. À Rosana Serpa, à Lívia Galdino, ao Kleybson Sousa, à Raquel Colares, ao Jaime Acostae ao Fernando Monteiro pela ajuda nos procedimentos experimentais, que foram essenciais no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos demais colegas: Jonathas Sales, Renan Vasconcelos, Gessica Araújo, Ane Teles, Gleiciane Rocha, Tony Evangelista, Jamille Alencar, Lara de Aguiar, Jônatas Franco, Silviane Praciano, Xhaulla Fonseca, Lana Glerieide, Patrícia Bruna, Santiago Bezerra, Gyrliane Sales, Mariana Pergentino e Bárbara, Alexandre e Gerlane, pelo agradável convívio diário, pela ajuda na bancada, pelas risadas cotidianas e pela troca de conhecimentos, sem dúvida esses fatores contribuíram bastante para o êxito desse trabalho.

Aos funcionários dessa Instituição, em especial às técnicas de laboratório, Terezinha Rodrigues e Gláucia Guedes, e à secretária Carolinda Soares (Carol), pela disponibilidade para ajudar no que fosse preciso, ao longo desses dois anos.

À CAPES pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílioe ao CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France.

RESUMO

Espécies de *Trichosporon* são conhecidas por causar infecções superficiais, como a *pedra branca*. Porém, nas últimas décadas, este gênero fúngico tem se destacado em casos de infecções invasivas e disseminadas em pacientes imunocomprometidos, os quais têm o quadro clínico agravado, quando as células fúngicas se associam na forma de biofilmes, em dispositivos médicos, apresentando resistência a diversos antifúngicos. Dessa forma, a necessidade de se pesquisar novas estratégias de controle traz como uma alternativa o butirato de sódio (ButNa), um inibidor de histona desacetilase capaz de alterar a conformação da cromatina. Esta droga tem sido estudada na modulação de estados epigenéticos, promovendo redução da expressão de fatores de virulência, além de alterações no crescimento de fungos patogênicos, como *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. O objetivo da presente pesquisa foi investigar o efeito, *in vitro*, do ButNa sobre o crescimento, a morfologia e a sensibilidade a antifúngicos de cepas clínicas de *T. asahii* (n=3) e *T. inkin* (n=7). Os isolados utilizados pertencem à Coleção de Culturas do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará e foram recuperados e mantidos em Ágar Batata Dextrose, com incubação a 35°C por 48 h. As culturas de células planctônicas foram avaliadas quanto à sensibilidade, *in vitro*, ao ButNa, anfotericina B (AMB), voriconazol (VOR) e fluconazol (FLC), bem como foi investigada a interação do ButNa com os antifúngicos anteriormente citados frente às cepas de *Trichosporon* spp. Analisou-se, também, a sensibilidade, quanto à biomassa e atividade metabólica, das células sésseis na fase de adesão, desenvolvimeno e biofilme maduro frente ao ButNa, assim como avaliou-se a presença de interação farmacológica entre o ButNa e AMB, VOR, FLC e caspofungina (CAS) sobre biofilmes de *Trichosporon* spp.. Adicionalmente, foi investigada a ação do ButNa sobre a morfologia de células planctônicas e sésseis e sobre a ultraestrutura de biofilmes maduros de *Trichosporon* spp. Todos os testes foram realizados em triplicata, e os resultados avaliados estatisticamente por teste de variância ANOVA, pós-teste de Bonferroni, teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn para comparação entre os valores encontrados ($p < 0,05$). O ButNa inibiu o crescimento das células planctônicas em 50% nas concentrações 60 mM e 120mM. Em biofilmes, na fase de adesão, houve uma redução da atividade metabólica de, em média, 10% (CIM) e 45% (10xCIM). Na etapa de formação, o declínio da atividade metabólica foi de 25% (CIM) e 63% (10xCIM). Também nessa fase, houve diminuição da biomassa em 45% (CIM) e 81% (10xCIM). Em biofilme maduro, observou-se um decréscimo de 18% da atividade metabólica (CIM) e de 48% (10xCIM), bem como redução da biomassa em 51% (CIM) e 77% (10xCIM). No teste de interação entre os fármacos, observou-se que o ButNa potencializou o efeito da maioria dos antifúngicos testados, *in vitro*, tanto em células planctônicas quanto em biofilme. O ButNa alterou a morfologia de *Trichosporon* spp, diminuindo a filamentação em células planctônicas e desestruturando biofilmes. Portanto, o ButNa apresenta atividade antifúngica, *in vitro*, e potencial para combater espécies patogênicas emergentes do gênero *Trichosporon*.

Palavras-chave: *Trichosporon asahii*; *Trichosporon inkin*; biofilmes; butirato de sódio.

ABSTRACT

Species of *Trichosporon* are known to cause superficial infections, such as white *pie*dra. However, this fungus has been prominent in recent decades in invasive and disseminated infections in immunocompromised patients. When fungal cells associate, forming biofilms in medical devices, the clinical condition worsens, with the occurrence of resistance to various antifungal agents. Thus, the need to research new control strategies led to an alternative: sodium butyrate (NaBut), a histone deacetylase inhibitor that can alter chromatin conformation. This inhibitor has been used to modulate epigenetic states, presenting an expressive effect on the decrease of the expression of virulence factors and changes in the growth of pathogenic fungi, such as *Cryptococcus* spp. and *Candida* spp. The objective of this study was to investigate the effects, *in vitro*, of the sodium butyrate over the growth, morphology and sensitivity to antifungal of clinical strains of *T. asahii* (n = 3) and *T. inkin* (n = 7), belonging to the Collection of Cultures of the Specialized Center in Medical Mycology (SCMM), Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. All samples were recovered in Potato Agar Dextrose, incubated at 35 ° C for 48 h. The cultures were evaluated for *in vitro* susceptibility to NaBut and to antifungal agents for therapeutic use in planktonic cells and associated in biofilms. The occurrence of the interaction effect between NaBut and antifungal against strains of *Trichosporon* spp. were also evaluated. Additionally, the action of NaBut on the morphology of *Trichosporon* species was analyzed. All tests were performed in triplicate, and the results were statistically evaluated by test of variance ANOVA, Bonferroni post-test, Kruskal-Wallis test and Dunn post-test to compare the values found (p <0.05). NaBut inhibited the growth of planktonic cells by 50% at concentrations of 60 mM and 120 mM. In biofilms, at the adhesion phase, there was a reduction in metabolic activity of 10% (MIC) and 45% (10x MIC), on average. At the forming stage, the reduction in metabolic activity was 25% (MIC) and 63% (10x MIC). Also in this phase, the biomass decreased by 45% (MIC) and 81% (10x MIC). In mature biofilm, a decrease of 18% in metabolic activity (MIC) and 48% (10x MIC) was observed, as well as biomass reduction in 51% (MIC) and 77% (10x MIC). In the drug interaction test, NaBut enhanced the effect of most of the antifungal agents tested, *in vitro*, in planktonic cells and in biofilms. NaBut altered the morphology of *Trichosporon* spp, reducing filamentation in planktonic cells and de-structured biofilms. Therefore, NaBut has antifungal activity and the potential to inhibit pathogenic species of this emerging fungus.

Keywords: *Trichosporon asahii*; *Trichosporon inkin*; biofilms; sodium butyrate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Micromorfologia celular e macromorfologia das colônias de *Trichosporon* spp. (A) Seta aponta blastoconídeos; (B) Seta aponta pseudo-hifa; (C) Seta aponta presença de apressório em *T. inkin*; (D) Setas apontam artroconídeos e hifa verdadeira septada hialina. Morfofolia das colônias de *T. asahii* (E) e *T. inkin* (F) em ágar batata dextrose, evidenciando colônicas de coloração creme e branca, textura seca e relevo cerebriforme. (G) Teste da urease positivo (cor rosa) e negativo (cor amarela)..... 25
- Figura 2** – Infecções superficiais causadas por *Trichosporon* spp. (A) Seta aponta múltiplos nódulos de coloração marrom-clara em volta do cabelo; (B) Seta aponta nódulo envolvendo fio de cabelo (TrichoScan®); (C) Seta aponta presença de abundantes artroconídeos em pelo corado com clorazol negro (x40); (D) Onicomiose causada por *T. asahii* e *T. asteroides*..... 26
- Figura 3** – Etapas do desenvolvimento do biofilme. (1) Adesão reversível em superfície biótica ou abiótica; (2) Formação de microcolônias com início do sistema *Quorum sensing*; (3) Adesão irreversível com produção de MEP e estabelecimento do biofilme maduro permeado por canais de água; (4) Ruptura do biofilme com dispersão de células..... 31
- Figura 4** – Representação esquemática dos diferentes níveis de condensação do DNA humano. (A) Dupla hélice de DNA; (B) Nucleossomos; (C) Nucleossomos enrolados; (D) Cromatina desespiralizada (eucromatina); (E) Cromatina condensada (heterocromatina); (F) Cromossomo condensado..... 35
- Figura 5** – Representação esquemática do DNA envolvendo o octâmero de histonas e formando um complexo estabilizado pela histona H1..... 36

- Figura 6** – Representação esquemática das histonas com suas caldas laterais com resíduos de lisina, onde há a reação de acetilação e desacetilação. (A) Octâmero de histonas, com suas caldas laterais, envolvido por uma fita de DNA; (B) Reação de acetilação e desacetilação do resíduo de lisina da calda lateral das histonas; (C) Representação esquemática da eucromatina (transcricionalmente ativa) e da heterocromatina (transcricionalmente inativa), em processo dinâmico de acetilação/desacetilação de histonas..... 37
- Figura 7** – Representação esquemática da regulação de HDAC sobre os principais fenótipos de virulência em *C. neoformans*. As células captam estímulos ambientais (pH, alta temperatura, estresse nutricional ,etc.) através de receptores de membrana e um sinal é transmitido para seu interior. O sinal resulta em uma resposta adaptativa que requer remodelamento da cromatina mediado pelo equilíbrio entre a atividade da HAT e HDAC. As enzimas HDAC desempenham importante papel regulatório na expressão de todos os fenótipos de virulência mostrados no esquema. A perda de enzimas HDAC interfere na resposta adaptativa correta aos sinais ambientais e prejudica a expressão dos fatores de virulência..... 39
- Figura 8** – Fórmula estrutural do butirato de sódio..... 40
- Figura 9** – Organograma das principais etapas experimentais do estudo. A quantidade de cepas utilizadas em cada experimento está representada entre parênteses..... 46
- Figura 10** – Efeito do ButNa sobre a atividade metabólica e a biomassa de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, expressos como porcentagens relativas da absorbância do ensaio de redução de XTT (A, C e E) e coloração com violeta de cristal (B, D e F) , respectivamente. (A e B) Adesão de células de *Trichosporon* spp. após incubação por 6 h com ButNa. (C e D) Biofilme em desenvolvimento (em contato com o ButNa após 6h de crescimento). (E e F) Biofilmes maduros (em contato com o ButNa após 48 h de crescimento). Barras negras representam controle de crescimento livre de

drogas; barras cinza representam células expostas à CIM do ButNa e barras brancas representam biofilmes expostos a $10 \times$ CIM do ButNa. * Diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle de crescimento livre de drogas (p <0,05)..... 55

Figura 11 – Efeito do ButNa combinado com antifúngicos na adesão celular de cepas de *T. asahii* (n=1) e *T. inkin* (n=1), expresso como porcentagens relativas da absorvância do ensaio de redução de XTT, indicando redução da atividade metabólica. (A) ButNa combinado com AMB. (B) ButNa combinado com FLC. (C) ButNa combinado com VRC. (D) ButNa combinado com CAS. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; barras cinza-escuras representam células expostas à CIM do ButNa; barras cinza-claras representam células expostas à CIM dos antifúngicos e barras brancas representam as células expostas à CIM da combinação ButNa/ATF. * Diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle de crescimento livre de drogas (p <0,05). # Diferenças estatisticamente significantes, quando comparado o ATF sozinho com a combinação ButNa/ATF (p <0,05)..... 56

Figura 12 – Efeito do ButNa combinado com antifúngicos no desenvolvimento do biofilme de cepas de *T. asahii* (n=1) e *T. inkin* (n=1), expresso como porcentagens relativas da absorvância do ensaio de redução de XTT (A, C, E e G) e coloração com cristal violeta (B, D, F e H), respectivamente. (A e B) ButNa combinado com AMB. (C e D) ButNa combinado com FLC. (E e F) ButNa combinado com VRC. (G e H) ButNa combinado com CAS. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; barras cinza-escuras representam biofilmes expostos à CIM do ButNa; barras cinza-claras representam biofilmes expostos à CIM dos antifúngicos e barras brancas representam biofilmes expostos à CIM da combinação ButNa/ATF. * Diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle de crescimento livre de drogas (p <0,05).

#Diferenças estatisticamente significantes, quando comparado o ATF sozinho com a combinação ButNa/ATF ($p < 0,05$)..... 57

Figura 13 – Efeito do ButNa combinado com antifúngicos em biofilmes maduros de cepas de *T. asahii* (n=1) e *T. inkin* (n=1), expresso como porcentagens relativas da absorbância do ensaio de redução de XTT (A, C, E e G) e coloração com cristal violeta (B, D, F e H), respectivamente. (A e B) ButNa combinado com AMB. (C e D) ButNa combinado com FLC. (E e F) ButNa combinado com VRC. (G e H) ButNa combinado com CAS. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; barras cinza-escuras representam biofilmes expostos à CIM do ButNa; barras cinza-claras representam biofilmes expostos à CIM dos antifúngicos e barras brancas representam biofilmes expostos à CIM da combinação ButNa/ATF. * Diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle de crescimento livre de drogas ($p < 0,05$). # Diferenças estatisticamente significantes, quando comparado o ATF sozinho com a combinação ButNa/ATF ($p < 0,05$)..... 59

Figura 14 – Efeito do ButNa sobre a morfologia de *T. asahii* e *T. inkin* em microcultivo. (A e B) *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074), respectivamente, controle de crescimento sem adição do ButNa. (C e D) Células de *T. asahii* e *T. inkin* após exposição à CIM do ButNa. (E e F) Células de *T. asahii* e *T. inkin* após exposição à $2 \times$ CIM do ButNa. Na seta (a) hifa artroconidiada ramificada; (b) hifas hialinas. Em (c) e (e) blastoconídios; (d e f) hifas hialinas vacuolizadas. Imagens inspecionadas sob um microscópio óptico usando objetiva de 40x. A cor azul das estruturas é devida à solução azul de algodão lactofenol..... 61

Figura 15 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilme maduro de *T. asahii* and *T. inkin*. (A e B) Controle de crescimento do biofilme maduro

de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, sem exposição ao ButNa. (C e D) Biofilme maduro de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, após exposição à CIM planctônica do ButNa, evidenciando comprometimento de sua estrutura. (E e F) Biofilme maduro desestruturado de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, após exposição à 10xCIM planctônica do ButNa. Setas brancas com borda preta indicam canais de passagem de água. Seta preta indica artroconídeos. Seta branca indica hifa colabada e com estrutura comprometida. Magnitude: 1000x..... 63

Figura 16 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074). (A e D) Controle de crescimento de biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, sem adição de ButNa. (B and E) Biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, após exposição à CIM planctônica do ButNa. (C e F) Biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, após exposição à 10x a CIM planctônica do ButNa. 64

Figura 17 Os gráficos representam a intensidade colorimétrica das células vivas e mortas / danificadas coradas com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente, adquiridas através de microscopia confocal de varredura a laser. (A) Biomassa, (B) Espessura, (C) Biovolume e (D) Intensidade de fluorescência de biofilmes maduros de *Trichosporon* (48 h) em meio RPMI (barras pretas), RPMI adicionada CIM planctônica do ButNa (barras cinzas) e RPMI adicionado de 10xCIM planctônica do ButNa (barras brancas)..... 65

LISTA DETABELAS

- Tabela1** – Identificação e origem de isolamento das cepas *Trichosporon* utilizadas neste estudo..... 44
- Tabela 2** – Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Trichosporon asahii* e *T. inkin* frente ao butirato de sódio (ButNa), anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC) e voriconazol (VOR)..... 53
- Tabela 3** – Interação do butirato de sódio (ButNa) com os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC) e voriconazol (VOR) frente às células planctônicas de *Trichosporon. asahii* e *T. inkin*..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ATF	Antifúngico
ButNa	Butirato de Sódio
CAS	Caspofungina
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
FLU	Fluconazol
GXM	Glucoronoxilomanana
HAT	Histonas acetiltransferases
HDAC	Histonas desacetilases
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionária
IHDAC	Inibidores de histonas desacetilases
IGS	<i>Intergenic Spaces</i>
IFIs	Infecções Fúngicas Invasivas
ITS	<i>Internal Transcriber Spacer</i>
MEP	Matriz Extracelular Polimérica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rDNA	DNA ribossomal
rpm	Rotações por minuto
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
VOR	Voriconazol
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H hidróxido de tetrazólio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Panorama histórico do gênero <i>Trichosporon</i>	22
2.2	O gênero <i>Trichosporon</i>	23
2.2.1	<i>Características gerais e identificação laboratorial</i>	23
2.2.2	<i>Infecções por <i>Trichosporon spp.</i></i>	26
2.2.3	<i>Fatores de virulência</i>	28
2.2.4	<i>Biofilme</i>	29
2.2.5	<i>Sensibilidade aos antifúngicos</i>	32
2.3	Histonas desacetilases (HDAC)	35
2.3.1	<i>HDAC</i>	35
2.3.2	<i>HDAC em fungos</i>	37
2.4	Inibidores de histona desacetilases (iHDAC)	38
2.4.1	<i>iHDAC- aspectos gerais</i>	38
2.4.2	<i>Butirato de sódio (ButNa)</i>	40
3	HIPÓTESES	42
4	OBJETIVOS	43
4.1	4.1 Objetivo geral	43
4.2	4.2 Objetivos específicos	43
5.	MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1	Local de estudo	44
5.2	Microrganismos	44
5.3	Desenho experimental	45
5.4	Drogas	46
5.5	Teste de sensibilidade planctônica	46
5.6	Teste de interação farmacológica com antifúngicos	47
5.7	Teste de sensibilidade em biofilme	48
5.7.1	<i>Efeito do ButNa sobre a adesão celular</i>	48
5.7.2	<i>Efeito do ButNa sobre o desenvolvimento do biofilme</i>	48
5.7.3	<i>Efeito do ButNa sobre biofilme maduro</i>	49

5.8	Teste de interação farmacológica com antifúngicos em biofilme.....	49
5.8.1	<i>Efeito do ButNa combinado com antifúngicos na adesão do biofilme.....</i>	49
5.8.2	<i>Efeito do ButNa combinado com antifúngicos no desenvolvimento do biofilme</i>	50
5.8.3	<i>Efeito do ButNa combinado com antifúngicos em biofilme maduro.....</i>	50
5.9	Ensaio de filamentação.....	50
5.10	Microscopia eletrônica de varredura.....	51
5.11	Microscopia confocal de varredura a laser.....	51
5.12	Análise estatística.....	52
6	RESULTADOS.....	53
6.1	Efeito do ButNa sobre o crescimento planctônico de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	53
6.2	Interação do ButNa com antifúngicos frente a células planctônicas de <i>T. asahii</i> e <i>T. inki</i>	53
6.3	Efeito do ButNa sobre biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	54
6.4	Interação do ButNa com antifúngicos frente a células sésseis de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	55
6.4.1	<i>Efeito da interação do ButNa com antifúngicos na adesão celular.....</i>	55
6.4.2	<i>Efeito da interação do ButNa com antifúngicos no desenvolvimento do biofilme.....</i>	56
6.4.3	<i>Efeito da interação do ButNa com antifúngicos no biofilme maduro.....</i>	58
6.5	Efeito do ButNa na micromorfologia de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	60
6.6	Efeito do ButNa sobre a morfologia e a estrutura de biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	62
6.6.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	63
6.6.2	<i>Microscopia confocal de varredura a laser.....</i>	64
7	DISCUSSÃO.....	66
8	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas invasivas (IFIs) são um problema de saúde pública e têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas, contribuindo para a elevação das taxas de mortalidade e morbidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos (CHANG *et al.* 2017; REVIE *et al.* 2018). Fungos patogênicos são responsáveis por bilhões de infecções anualmente, causando morte de cerca de 1,5 milhões de pessoas ao redor do mundo (CHANG *et al.* 2017; CAMPOY E ADRIO, 2016). Apesar disso, muitas das infecções fúngicas ainda são negligenciadas (BROWN *et al.*, 2012; ROBBINS, WRIGHT E COWEN, 2016).

As infecções fúngicas oportunistas são causadas, em grande parte, por microrganismos dos gêneros *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*. Porém, alguns fungos que, antes eram considerados de baixa capacidade invasiva, têm ganhado destaque em infecções sistêmicas, sendo citados como patógenos emergentes (XIE *et al.*, 2014; REVIE *et al.* 2018). Nesse contexto, destaca-se o gênero *Trichosporon*, cujas espécies têm sido consideradas a segunda maior causa de infecções sistêmicas originadas por leveduras em pacientes com doenças hematológicas malignas, apresentando resistência a anfotericina e equinocandinas, além de possuir o diagnóstico ao nível de espécie dificultado por demandar tempo e técnicas de alto custo (DE ALMEIDA JÚNIOR E HENNEQUIN, 2016; MONTOYA, *et al.* 2017).

A crescente incidência de infecções invasivas causadas por *Trichosporon* spp. pode ser explicada por sua capacidade de expressar fatores de virulência que contribuem para a disseminação no hospedeiro imunocomprometido, como diferenciação em hifas, síntese de enzimas extracelulares e, principalmente, associação em biofilmes que, em conjunto com a condição clínica debilitada dos pacientes, geram infecções graves e de difícil tratamento (SUN *et al.*, 2012; MARINÉ *et al.*, 2015a; MONTOYA, *et al.* 2017).

A capacidade de formar biofilme tem sido uma característica bem estudada em diversos microrganismos, pois estima-se que 80% das infecções humanas estejam associadas à formação de biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas, como cateteres e próteses (RÖMLING e BALSALOBRE, 2012). No caso de infecções invasivas por *Trichosporon*, esse é um importante fator de virulência, já que está ligado diretamente aos casos de doença invasiva em pacientes hospitalizados usuários de dispositivos médicos intracorpóreos, estando associados à mortalidade dos pacientes imunocomprometidos e à resistência aos antimicrobianos (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; MONTOYA *et al.*, 2018).

Dessa forma, tem-se ampliado os estudos em diversas áreas, na busca de novos tratamentos para o combate dessas infecções. Nesse contexto, o remodelamento da cromatina

tem sido relacionado com a regulação da expressão de genes para a produção dos fatores de virulência, com a resistência a antifúngicos e/ou com a resposta a diferenças ambientais em fungos como *Neurospora crassa* (NOLAN *et al.*, 2005), *Aspergillus fumigatus* (PALMER *et al.*, 2008), *Candida albicans* (LOHSE e JOHNSON, 2010), *Paracoccidioides brasilienses* (OLIVEIRA, 2012), *Schizosaccharomyces pombe* (ZHANG *et al.*, 2013), *Cryptococcus neoformans* (BRANDÃO *et al.*, 2015).

Existem muitos fatores epigenéticos que promovem alterações na cromatina, e, dentre eles, pode-se citar a acetilação (catalisada pelas enzimas histonas acetiltransferases - HAT) e a desacetilação de grupos aminas presentes em resíduos de lisina de histonas (catalisada pelas enzimas histonas desacetilases - HDAC) (HAMILTON, 2011; COSTA e PACHECO, 2013; VOSS e HAGER, 2014).

Atualmente, há muitos estudos relacionados ao uso de inibidores de histonas desacetilases (iHDAC) como uma nova alternativa de tratamento para diversos tipos de doenças, como: câncer (TOPPER, *et al.*, 2017; SURAWEEERA, O'BYRNE e RICHARD, 2018), doenças neurológicas (BUONVICINO *et al.*, 2018) e doenças auto-imunes e inflamatórias (SELLMER, *et al.*, 2018). Porém, essa classe terapêutica tem obtido relevância, também, em estudos de regulação da transcrição gênica em microrganismos, como vírus (ZAIKOS, *et al.*, 2018), bactérias (GRABIEC e POTEMPA, 2018) e fungos (NYGUEN, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2018).

Dentre os inibidores de histonas desacetilases utilizados em pesquisas encontra-se o butirato de sódio (ButNa), que é um ácido graxo de cadeia curta produzido por bactérias anaeróbias do intestino, por meio da fermentação de fibras (LEONEL e ALVAREZ-LEITE, 2012). Estudos mostram que o ButNa causa *down-regulation* da expressão de fatores de virulência e alterações no crescimento de fungos patogênicos, podendo representar uma opção no controle das infecções fúngicas invasivas (NGUYEN *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2015; BRANDÃO *et al.*, 2018).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama histórico do gênero *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* foi primeiro descrito em Londres, no ano de 1865, por Beigel, que observou esse microrganismo em perucas de cabelo humano (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011). A palavra tem origem grega e deriva da combinação de *trichos* (pêlo) e *sporon* (esporo). Em 1866, Ernst Hallier reconheceu a origem fúngica do isolado e homenageou Beigel, nomeando o fungo causador da *pedra* branca de *Sclerotiumbeigelii* (SIDRIM e ROCHA, 2004; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011)

Em 1867, o botânico e micologista alemão Rabenhorst isolou um organismo proveniente dos cabelos de uma peruca, denominando-o *Pleurococcusbeigelii* (RABENHORST, 1867 *apud* GUÉHO *et al.*, 1992). Três anos mais tarde, o dermatologista alemão Gustav Behrend cultivou um fungo oriundo da barba de um paciente com *pedra* branca e classificou-o como *Trichosporon ovoides* (BEHREND, 1890)

Desde então, outras espécies de *Trichosporon* foram relatadas. Porém, em 1902, o micologista francês Vuillemin observou uma infecção clínica em pêlos de bigode e se baseou nos estudos de Behrend, para definir que as diversas espécies propostas e definidas até o momento eram variações de uma mesma espécie, denominada *Trichosporonbeigelii* (KREGER-VAN RIJ, 1984; VUILLEMIN 1902 *apud* GUÉHO, DE HOOG e SMITH, 1992).

Em 1910, o dermatologista francês Beurmann cultivou um fungo de lesões de pele e nomeou-o *Oidiumcutaneum*, o qual anos depois foi denominado *Trichosporoncutaneum* (BEURMANN, GOUGEROT e VAUCHER, 1910; OTA, 1926). Em 1976, na Colômbia, Restrepo e Uribe foram os primeiros a suspeitar que *Trichosporon* poderia causar infecção em unhas e, em 1984, Fusaro e Miller descreveram o primeiro caso de onicomicose causada por esse fungo em um homem imunocompetente proveniente dos Estados Unidos (RESTREPO e URIBE, 1976; FUSARO e MILLER, 1984). A partir de então, todos os isolados clínicos de *Trichosporon* foram identificados como *Trichosporonbeigelii* ou seu sinônimo *Trichosporoncutaneum*, sendo tais nomenclaturas citadas em literaturas conceituadas e mantidas durante muito tempo (KREGER-VAN RIJ, 1984; GUÉHO *et al.*, 1994).

Porém, em 1992, por meio de técnicas moleculares, a micologista francesa Eveline Guého, juntamente com seus colaboradores, revisou a taxonomia do gênero *Trichosporon* e identificou um grande número de espécies, várias delas ocupando nichos ecológicos bem

definidos no corpo humano e, em decorrência deste estudo, a espécie *Trichosporon beigeli* foi extinta (GUÉHO *et al.*, 1992). Dentre as espécies identificadas, seis se destacavam quanto à patogênese e à frequência com que infectavam seres humanos: *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum* e *T. mucoides*. Sua importância se dava pela capacidade de causar *pieira* branca ou infecções cutâneas e por estarem envolvidas em micoses invasivas (localizadas ou disseminadas), principalmente em pacientes com quadro clínico de neoplasia hematológica ou imunossupressão (GUÉHO *et al.*, 1994).

Anos mais tarde, por meio de análise filogenética molecular, o gênero *Trichosporon* foi subdividido entre os clados Ovoides, Cutaneum, Porosum e Gracile/Brassicaceae, os quais compreendem 51 espécies. Dessas, observou-se que 17 possuem importância médica: *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. mucoides*, *T. dermatis*, *T. loubieri*, *T. jirovecii*, *T. montevidense*, *T. mycotoxinovorans*, *T. domesticum*, *T. japonicum*, *T. coremiiforme*, *T. dohaense*, *T. lactis*, *T. faecale* (TAVERNA *et al.*, 2014; MARINÉ *et al.*, 2015a).

Recentemente, baseados na análise de múltiplas sequências de genes, pesquisadores reavaliaram a taxonomia do gênero *Trichosporon* e propuseram novos gêneros para os clados monofiléticos, que incluem *Trichosporon*, *Cutaneotrichosporon* e *Apiotrichum* (LIU *et al.*, 2015). Esses gêneros compreendem espécies patogênicas intrinsecamente resistentes a equinocandinas e resistentes a outras classes de antifúngicos, apresentando, dessa forma, considerável relevância clínica (MARINÉ *et al.*, 2015a; DE ALMEIDA JÚNIOR e HENNEQUIN, 2016; DE ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2017).

2.2 O gênero *Trichosporon*

2.2.1 Características gerais e identificação laboratorial

O gênero *Trichosporon* compreende fungos que pertencem ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Tremellomycetes, ordem Trichosporonales, família Trichosporonaceae (KURTZMAN, FELL e BOEKHOUT, 2011). Morfologicamente, são basidiomicetos leveduriformes, podendo apresentar-se na forma de artroconídeos, blastoconídeos, hifas e pseudohifas hialinas (CHAGAS-NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008).

Sabe-se que existem mais de 50 espécies de *Trichosporon* spp. e, dentre elas, 17 são consideradas patogênicas para os humanos (MARINÉ *et al.*, 2015a). Recentemente, baseado em análise filogenética molecular, foi proposto que esse gênero se dividisse em três, a seguir mostrado com base nas espécies patogênicas que englobam: *Trichosporon* (*T. ovoides*, *T. inkin*,

T. asahii, *T. asteroides*, *T. japonicum*, *T. coremiiforme*, *T. dohaense*, *T. lactis*, *T. faecale*), *Cutaneotrichosporon* (*C. cutaneum*, *C. jirovecii*, *C. mucoides*, *C. dermatis*, *C. debeumannianum*), e *Apiotrichum* (*A. loubieri*, *A. mycotoxinovorans*, *A. montevidense*, *A. domesticum*) (LIU *et al.*, 2015; DE ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2017).

São organismos amplamente distribuídos na natureza, principalmente em áreas de clima tropical e temperado, podendo ser encontrados na água, no solo, em excrementos de diversos animais, em árvores em decomposição, dentre outros substratos (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011). Nos seres humanos, podem ocasionalmente fazer parte da microbiota permanente da mucosa oral e do trato gastrointestinal, bem como da microbiota transitória da pele, do trato respiratório superior e da área perigenital e perianal (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; CHO, MATSUKURA e SUGITA, 2015).

Morfologicamente, esses fungos podem se apresentar na forma de blastoconídeos, artroconídeos, hifas verdadeiras septadas hialinas e pseudo-hifas (Figura 1A-D), todas as estruturas referentes à fase assexuada do ciclo biológico. Algumas espécies possuem outras estruturas morfológicas úteis na caracterização fenotípica, como: apressórios (Figura 1C), macroconídeos ou conidiação meristemática. Até o momento, a fase sexuada não é conhecida (CHAGAS-NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008).

Quanto à macromorfologia das colônias, as espécies de *Trichosporon* variam em suas características fenotípicas intra e interespecíficas (ITURRIETA-GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Com crescimento moderado de 2 a 7 dias, suas colônias, em ágar Sabouraud dextrose, possuem morfologia radial simétrica, de cor branca (Figura 1F) a creme, podendo ser úmidas ou secas e de aspecto superficial liso ou cerebriforme (Figura 1E), apresentando ou não cobertura farinácea (DE HOOG *et al.*, 2000).

As espécies desse fungo são capazes de assimilar diferentes carboidratos e outras fontes de carbono, como monossacarídeos (pentoses e hexoses), dissacarídeos (celobiose, lactose, maltose, melibiose, sacarose, trealose), bem como polissacarídeos (amido e xilano) e compostos aromáticos (fenol, cresol, aminoácidos aromáticos, benzoatos esalicilatos). Porém, esses microrganismos não são fermentadores, ou seja, realizam apenas metabolismo oxidativo (KURTZMAN *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2015). Outra característica fisiológica é que, assim como os demais basidiomicetos, os fungos do gênero *Trichosporon* possuem a enzima urease dependente de níquel, o que os torna capazes de degradar a ureia em amônia e carbamato, sendo positivo no teste da urease (Figura 1G) (CHAGAS-NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008; LIU *et al.*, 2015).

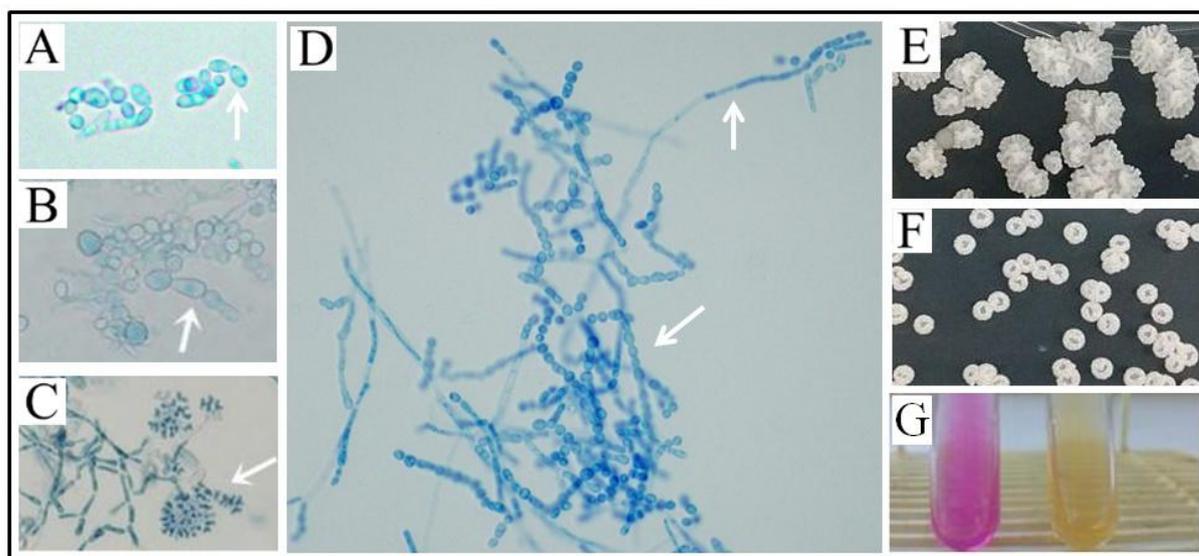


Figura 1. Micromorfologia celular e macromorfologia das colônias de *Trichosporon* spp. (A) Seta aponta blastoconídeos; (B) Seta aponta pseudo-hifa; (C) Seta aponta presença de apressório em *T. inkin*; (D) Setas apontam artroconídeos e hifa verdadeira septada hialina. Morfologia das colônias de *T. asahii* (E) e *T. inkin* (F) em ágar batata dextrose, evidenciando colônias de coloração creme e branca, textura seca e relevo cerebriforme. (G) Teste da urease positivo (cor rosa) e negativo (cor amarela). Fonte: Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM/UFC (2018).

Sabe-se que a identificação de *Trichosporon*spp. por métodos fenotípicos, como os baseados nas características macro e micromorfológicas das colônias, podem frequentemente gerar resultados contraditórios (GUO *et al.*, 2011; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011). Métodos de identificação por galerias, como API®/ ID32 (Biomerieux, França) e VITEK® MS™ (Biomerieux, França), são muito utilizados por serem práticos e apresentarem execução rápida, porém também possuem limitações (RUAN, CHIEN e HSUEH, 2009; TAJ-ALDEEN *et al.*, 2009; DE ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2017).

Por outro lado, estudos mostram que os métodos moleculares que utilizam amplificação de genes ribossomais por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) associada ao sequenciamento de regiões intergênicas ITS (*Internal Transcriber Spaces*), IGS (*Intergenic Spaces*) dos genes 26S e 5S do DNA ribossomal (rDNA), ou análise do domínio D1/D2 das regiões 26S do gene RNA representam maior confiabilidade no diagnóstico laboratorial de *Trichosporon* spp. (CHAGAS-NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008; MONTOYA *et al.*, 2015; DABAS, XESS e KALE, 2017).

Outra técnica utilizada atualmente é a espectrometria de massa através da ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALDI-TOF), a qual vem se mostrando

promissora, por ser um recurso rápido e preciso, utilizando análise proteômica como meio para identificação fúngica, e capaz de gerar resultados com índices de confiabilidade aceitáveis (BUCHAN e LEDEBOER, 2014; DE ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016).

2.2.2 Infecções por *Trichosporon*spp.

Espécies de *Trichosporon* são mais associadas a infecções superficiais benignas, como *pieira* branca (Figura 2A-C), a qual se caracteriza pela presença de nódulos irregulares, de cor branca ou marrom clara, ao longo dos pêlos e cabelos afetados (CHAGAS-NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008; SANDOVAL-TRESS, ARENÁS-GUZMÁN e GUZMÁN-SÁNCHEZ, 2015). Nas infecções superficiais, pode ser encontrado em diversos locais, como barba, axila e área genital, podendo, também, infectar as unhas, causando onicomicose (Figura 2D) (MONTROYA *et al.*, 2015; SANDOVAL-TRESS, ARENAS-GUZMÁN e GUZMÁN-SÁNCHEZ, 2015; MAGALHÃES *et al.*, 2016; KOTWAL *et al.* 2018).

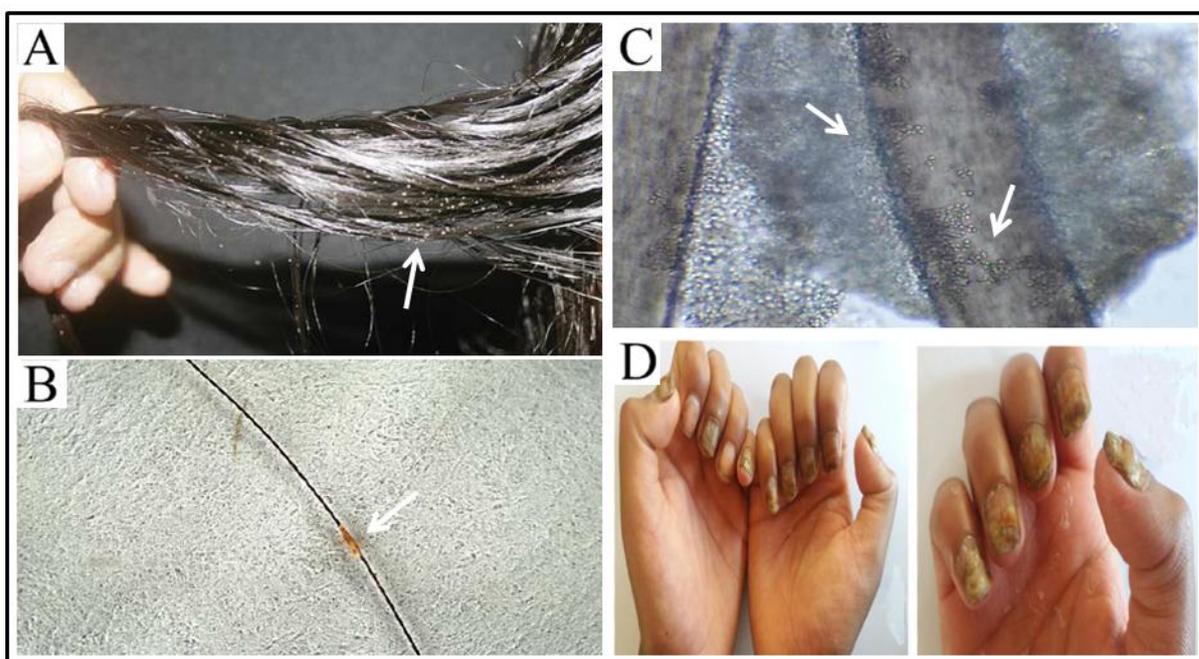


Figura 2. Infecções superficiais causadas por *Trichosporon* spp. (A) Seta aponta múltiplos nódulos de coloração marrom-clara em volta do cabelo; (B) Seta aponta nódulo envolvendo fio de cabelo (TrichoScan®); (C) Seta aponta presença de abundantes artroconídeos em pelo corado com clorazol negro (x40); (D) Onicomicose causada por *T. asahii* e *T. asteroides*. Fonte: Sandoval-Tress, Arenás-Guzmán e Guzmán-Sánchez (2015); Kotwal *et al.* (2018).

Com base em estudos de identificação de fungos isolados de sítios acometidos de infecções superficiais, sugere-se que as principais espécies causadoras de *pieira* branca são

T. inkin, *T. cutaneum*, *T. ovóides*, *T. loubieri* (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011). Por outro lado, no caso de onicomicoses, as espécies patogênicas mais isoladas são *T. cutaneum* e *T. ovóides*, porém outras espécies também podem estar presentes, como *T. asahii* e *T. asteroides* (ARCHER-DUBON *et al.*, 2003; KOTWAL *et al.* 2018; MAGALHÃES *et al.*, 2016).

Embora prioritariamente cause infecções superficiais, espécies de *Trichosporon* podem estar associadas a diferentes quadros infecciosos, como pneumonite por hipersensibilidade, com maior incidência no Japão (MICELI, DÍAZ, LEE, 2011; ABE *et al.* 2018), além de ocasionar quadros infecciosos invasivos, localizados, como endoftalmite fúngica (GONUL *et al.*, 2015; SCOFIELD-KAPLAN *et al.*, 2018) e ou disseminados, em pacientes imunocomprometidos (LIAO *et al.*, 2015). Nesses casos, há intensa proliferação do fungo, expressão dos seus fatores de virulência e piora da resposta clínica do paciente aos tratamentos antifúngicos comumente utilizados, muitas vezes culminando com o óbito (SUZUKI *et al.*, 2010; DE ALMEIDA JÚNIOR e HENNEQUIN, 2016).

Em uma revisão de literatura, Liao e colaboradores (2015) analisaram a ocorrência de 185 casos de infecção por *Trichosporon* spp., ocorridas entre os anos 1975 e 2014 e distribuídos pela América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa. Nesse estudo, foi observado que os pacientes tinham as seguintes condições de risco / enfermidade de base: doenças hematológicas (57,4% dos pacientes, em que 77,36% destes tinham leucemia aguda), nascimento prematuro (7,57%), história de neutropenia (60,49%), tratamento quimioterápico (58,44%), uso de antimicrobianos (84,05%), terapia antifúngica profilática (43,24%), uso de cateter venoso central (52,1 %), história de terapia com corticosteróides (22,0%). O estudo mostrou que, no geral, a incidência de infecções por *Trichosporon* spp. tem aumentado nas últimas quatro décadas, sendo a maioria dos casos infecções teciduais invasivas ou infecções disseminadas por esses patógenos.

Com relação aos casos de tricosporonose invasiva causada por uso de cateter venoso central ou dreno, ou por outros dispositivos médicos intracorpóreos, acredita-se que ocorre devido a estes serem uma porta de entrada para o referido fungo, que, ocasionalmente, pode colonizar a pele e o trato gastrointestinal, bem como outras regiões dos seres humanos (CHO, MATSUKURA e SUGITA, 2015). Além disso, outros fatores podem estar associados com o surgimento de IFIs causadas por *Trichosporon* spp., como queimaduras (TAMAYO *et al.*, 2015) e cirurgia (MADA *et al.*, 2018), com agravamento do quadro clínico dos pacientes.

Em uma ampla revisão sistemática realizada por De Almeida Júnior e Hennequin (2016), buscando casos de tricosporonose invasiva documentadas entre os anos de 1994 e

2015, a nível mundial, verificou-se que, ao longo desse período, o número de casos notificados aumentou significativamente de 25,8% (de 1994 a 2004) para 74,2% (entre 2005 e 2015). Dos 203 casos analisados, 95 (46,7%) foram causados por *T. asahii* e 16 (7,9%) por *T. inkin*, o que evidencia a importância clínica dessas espécies. Os demais casos estudados foram ocasionados, ao todo, por outras nove espécies diferentes.

2.2.3 Fatores de virulência

Fatores de virulência correspondem ao conjunto de todas as características expressas pelos microrganismos, que contribuem para o estabelecimento da infecção no hospedeiro (HÖFS, MOGAVERO E HUBE, 2016). Sabe-se que espécies patogênicas de *Trichosporon* possuem diversos fatores de virulência, dentre eles: a formação de hifas, a produção de enzimas extracelulares, a produção de glucuronoxilomanana (GXM) na parede celular, *oswitching* fenotípico morfológico das colônias e a capacidade de se associar na forma de biofilme (ICHIKAWA *et al.*, 2004; MARINÉ *et al.*, 2015b; MONTOYA *et al.*, 2015).

A alternância entre as formas leveduriforme e filamentosa facilita a invasão do patógeno (MARINÉ *et al.*, 2015a). As análises de amostras provenientes de lesões em pacientes revelam que muitas das complicações observadas em casos de tricosporonose invasiva ocorrem em virtude de embolia vascular ou trombo necrótico proveniente da angioinvasão pelas hifas do referido fungo, o que pode levar a infarto multifocal dos órgãos acometidos (TAMAYO *et al.*, 2015; ZUO *et al.*, 2015; MADA *et al.*, 2018).

A produção de diversas exoenzimas, tais como proteases, lipases, fosfolipases, DNase, esterases e hemolisinas, contribui para o estabelecimento do parasitismo do hospedeiro, sendo um importante mecanismo de disseminação desse fungo (SUN *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2016). Essas enzimas podem atuar na degradação de componentes teciduais do hospedeiro, auxiliando na invasão tecidual e celular e promovendo a obtenção de nutrientes (MARINÉ, 2015a). Além disso, podem degradar proteínas de defesa do hospedeiro, bem como promover processos inflamatórios (GABRIELLI *et al.*, 2016).

A capacidade de sintetizar GXM, um polissacarídeo composto por blocos de polissacarídeos similares à α -1,3-D-manana, com glicosilações nas posições O-2, O-4 e O-6 dos resíduos de manose na parede celular é uma importante característica estrutural semelhante ao GXM produzido por *Cryptococcus neoformans* (FONSECA *et al.*, 2009). Em *Trichosporon*, o GXM faz parte da constituição da parede celular desse fungo, já em *C. neoformans*, o GXM se encontra na cápsula, representando um importante fator de

virulência, pois dificulta a fagocitose (MARINÉ *et al.*, 2015b). As principais diferenças entre a molécula de GXM sintetizada pelo *Trichosporon* e aquela sintetizada pelo *C. neoformans* (sorotipo A) referem-se a posição da xilose no polissacarídeo e a quantidade de unidades de manose. Contudo, devido à semelhança estrutural geral da molécula de GXM, acredita-se que *Trichosporon Cryptococcus* compartilhem características no que tange a virulência e a interação patógeno-hospedeiro (KANAFANI e PERFECT, 2008).

Oswitching fenotípico morfológico de *Trichosporon* é a mudança nas características macroscópicas de suas colônias e, apesar de não muito estudado, é considerado um importante fator de virulência relacionado com a adesão celular em *T. asahii* (ICHIKAWA *et al.*, 2004). Outro fator de virulência que está sendo atualmente estudado em *Trichosporon* é a produção de melanina na presença do precursor L-DOPA, podendo atuar protegendo o fungo contra estresse oxidativo, fagocitose e ação dos agentes antifúngicos (DE CARVALHO *et al.*, 2014).

A capacidade que o *Trichosporon* tem de crescer em superfície exógena, como em cateter venoso central, permite que haja a adesão e formação de biofilme nesse ambiente, o qual, estando diretamente em contato com o hospedeiro imunocomprometido, causa uma infecção difícil de ser tratada, já que o fungo se torna pouco ou não responsivo à maioria dos antifúngicos comumente utilizados na clínica (ITURRIETA-GONZÁLEZ, 2014; CORDEIRO *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016; MONTROYA *et al.*, 2018).

2.2.4 Biofilme

O principal fator de virulência em *Trichosporon* é a associação em biofilmes. Estima-se que 65% das infecções nosocomiais e 80% de todas as infecções microbianas são originadas a partir da formação de biofilmes (RÖMLING e BALSALOBRE, 2012). Na maioria dos casos, as células microbianas se aderem em dispositivos médicos invasivos, promovendo infecções de difícil tratamento (FLEMMING *et al.*, 2016).

Biofilmes são comunidades microbianas complexas em que suas células estão envoltas por uma matriz extracelular polimérica (MEP) e aderidas a uma superfície biótica ou abiótica (VERT *et al.*, 2012). A matriz do biofilme consiste em uma rede de polímeros com diferentes propriedades químicas e físicas, é estabilizada por ligações intra e intermoleculares e possui elevada porcentagem de água (em torno de 97%) em sua composição (DECHO, 2016; FLEMMING *et al.*, 2016).

Dentre os componentes da MEP estão: carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, sendo que o DNA imerso na matriz extracelular desempenha função estrutural e protetora ao

biofilme (ZARNOWSKI *et al.*, 2014). A MEP está diretamente relacionada com a resistência do biofilme à resposta imune do hospedeiro e à ação dos fármacos, pois atua na defesa contra as células fagocitárias, forma uma barreira que dificulta a penetração dos antimicrobianos e age como suporte na manutenção da integridade e da estrutura do biofilme (FLEMMING *et al.*, 2016; SANDAI *et al.*, 2016).

A organização das células microbianas na forma de biofilme confere aos patógenos muitas vantagens quando comparadas as células planctônicas, dentre elas: resistência a estresses físicos e químicos e regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo celular, promovendo maior produção enzimática e cooperação metabólica (RAMAGE *et al.*, 2012; GABRIELLI *et al.*, 2016). Essas células sintetizam moléculas específicas de *quorum sensing* – sistema que regula a transcrição de genes específicos e a densidade celular – e produzem proteínas que bloqueiam o sistema complemento (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013). Além disso, expressam *agglutinin-like genes* (ALS), cujos produtos contribuem para a adesão às células do hospedeiro (GULATI e NOBILE, 2016).

Para a formação do biofilme (Figura 3), primeiramente as células planctônicas se aderem a uma superfície biótica (ligações específicas do tipo receptor-ligante) ou abiótica (mediada por interações físico-químicas não específicas). Nesta etapa chamada de adesão reversível, há aumento na produção, na liberação e na detecção de moléculas sinalizadoras auto-indutoras que regulam a formação de biofilme, aumentando a densidade celular e induzindo a transcrição de genes específicos que regulam, por exemplo, a produção da MEP, a formação de biofilmes e a produção de fatores de virulência. Esse sistema, como referido anteriormente, é chamado de *quorum sensing* (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013).

Em seguida, dá-se início a adesão irreversível, a qual começa com a produção da matriz extracelular polimérica e segue com aumento da biomassa e densidade celular (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013). Na fase de biofilme maduro, as células estão agregadas e envoltas pela MEP e permeadas por canais de água, que funcionam como canal de passagem de nutrientes e como meio de remoção de restos metabólicos (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013; FLEMMING *et al.*, 2016). Por fim, as células começam a se destacar da estrutura do biofilme e são liberadas para o meio externo na forma de leveduras (UPPULURI *et al.*, 2010).

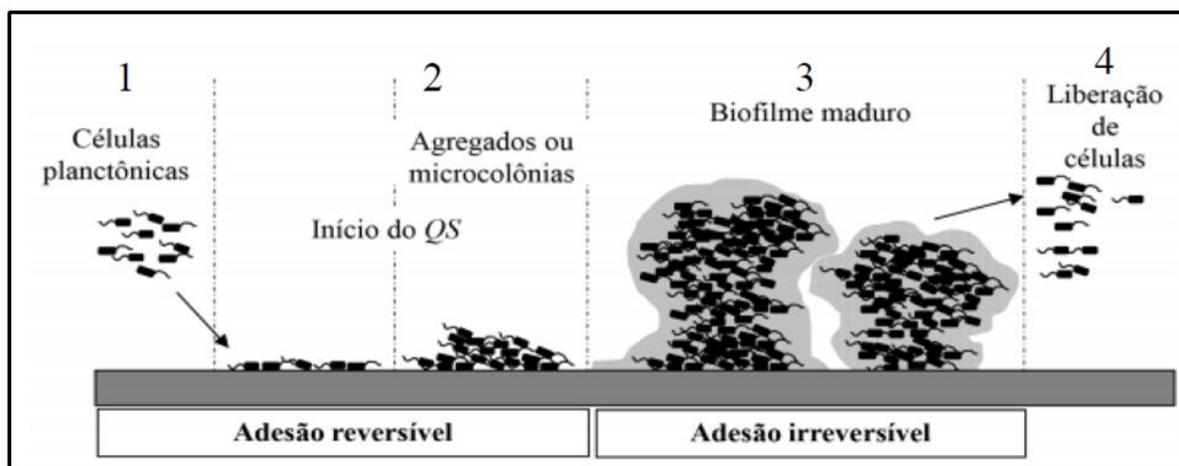


Figura 3. Etapas do desenvolvimento do biofilme. (1) Adesão reversível em superfície biótica ou abiótica; (2) Formação de microcolônias com início do sistema *quorum sensing*; (3) Adesão irreversível com produção de MEP e estabelecimento do biofilme maduro permeado por canais de água; (4) Ruptura do biofilme com dispersão de células. Fonte: Adaptado de Trentin, Giordani e Macedo (2013).

Di Bonaventura e colaboradores, em 2006, avaliaram a capacidade que *T. asahii* tem de aderir em superfície de poliestireno e concluíram que esse fungo, além de ser apto a formar biofilme, quando está nessa forma, gera infecções mais persistentes e menos responsivas a tratamentos com diversos fármacos. Com relação à morfologia do biofilme de *Trichosporon*, estudos relatam a presença de diversas estruturas características vistas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): blastoconídios, hifas, artroconídios e filamentos de MEP em torno das células (DI BONAVENTURA *et al.*, 2006; ITURRIETA- GONZÁLEZ *et al.*, 2014; CORDEIRO *et al.*, 2015).

Cordeiro e colaboradores, em 2015, estudaram a habilidade de *T. inkin* em formar biofilme em superfície de poliestireno, bem como sua capacidade de produzir protease extracelular. Nesse trabalho, foi observado que o período que as células planctônicas de *Trichosporon* precisam para se aderir na superfície de poliestireno é de seis horas, e o tempo para se ter um biofilme maduro é 48 horas. Também foi verificado que tanto as células planctônicas quanto as células sésseis foram capazes de produzir protease extracelular, porém a produção de protease em biofilme começou após seis horas de incubação (período de adesão) e aumentou continuamente até o tempo de 48 horas, já nas células planctônicas a produção começou após seis horas e se manteve praticamente constante, mostrando que, em biofilmes, a produção de protease é mais intensa, podendo ser este um dos parâmetros para explicar a maior virulência das células sésseis de *Trichosporon* spp. (CORDEIRO *et al.*, 2015).

A aptidão que *Trichosporon* tem de se aderir a dispositivos médicos, principalmente em catéter venoso central, vesical e peritonal, aliado ao fato de que os pacientes portadores desses dispositivos geralmente estão em condições de imunossupressão, faz com que infecções fúngicas invasivas ocasionadas por *Trichosporon* spp. sejam clinicamente relevantes, já que, nesses casos, geralmente, há maior tolerância a diversos antifúngicos, o que pode, conseqüentemente, levar os pacientes infectados a óbito (LIAO *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2016; MONTOYA *et al.*, 2018).

2.2.5 Sensibilidade aos antifúngicos

A sensibilidade *in vitro* de fungos de importância clínica é, em sua maioria, avaliada por meio de técnicas de referência padronizadas por dois órgãos: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) (ARENDRUP *et al.*, 2014). Essas técnicas possibilitam a determinação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de diversos fármacos, o que auxilia na escolha do tratamento adequado para micoses (locais ou sistêmicas, superficiais ou profundas), bem como contribui para o conhecimento da epidemiologia local e global da resistência fúngica (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2015).

Um microrganismo é considerado resistente a um antimicrobiano, quando, em testes de sensibilidade *in vitro*, a concentração inibitória mínima (CIM) da droga é superior ao ponto de corte de sensibilidade daquele microrganismo (KANAFANI E PERFECT, 2008). O ponto de corte é o valor que caracteriza os isolados analisados em: sensíveis (quando o medicamento é um tratamento adequado), sensíveis dose-dependente (quando são sensíveis apenas em determinadas concentrações da droga), resistentes (a droga não é indicada como tratamento) e intermediários (a droga pode ser um tratamento apropriado em condições específicas) (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b; CLSI, 2012).

Os pontos de corte têm definição complexa, pois se baseiam na revisão crítica de diversos aspectos e podem variar de acordo com o órgão a que se tem como referência (CLSI ou EUCAST). O CLSI avalia as distribuições da CIM, critérios farmacocinéticos e farmacodinâmicos da droga, bem como a relação entre CIMs e desfecho clínico. Já o EUCAST tem os seguintes critérios: a dosagem mais comum usada em cada país europeu; a definição da população selvagem para cada microrganismo alvo ao nível da espécie e a determinação de limites epidemiológicos; a farmacocinética e a farmacodinâmica do fármaco analisado e a correlação das CIMs com o desfecho clínico dos pacientes tratados com essa droga (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2015; ARENDRUP *et al.*, 2016).

Há, também, casos em que o microrganismo apresenta sensibilidade ao fármaco em testes *in vitro*, porém, ao ser administrado em pacientes infectados, apresenta resistência clínica, pois não é capaz de erradicar a infecção (XIE *et al.*, 2014). Para explicar esse fato, pesquisadores frequentemente recorrem à “regra 60-90”, que diz que infecções causadas por isolados sensíveis aos fármacos *in vitro* respondem satisfatoriamente ao tratamento em 90% dos casos, contudo isolados resistentes são debelados em 60% dos casos (REX E PFALLER, 2002).

Os antifúngicos utilizados na prática clínica são limitados a poucas classes de fármacos e são divididos de acordo com seu mecanismo de ação nas células fúngicas: inibição da síntese de ergosterol (azólicos, alilaminas, derivados morfolínicos), alteração da permeabilidade da membrana celular por ligação ao ergosterol (derivados poliênicos), inibição da formação de parede celular (equinocandinas, nicamicina), inibição da produção de ácidos nucleicos (flucitosina) e inibição da síntese de microtúbulos (griseofulvina) (KATHIRAVAN *et al.*, 2012; CAMPOY E ADRIO, 2016). Atualmente, há três principais classes de antifúngicos aprovados para tratamento de infecções fúngicas invasivas: derivados poliênicos, derivados triazólicos e equinocandinas (CHANG *et al.*, 2017).

Os derivados poliênicos, com ênfase na Anfotericina B, têm uma estrutura anfifílica e, em virtude dessa propriedade, ligam-se à bicamada lipídica e formam um complexo com o ergosterol, levando a produção de poros na membrana celular dos fungos. Por conseguinte, há liberação do conteúdo citoplasmático e dano oxidativo, culminando com a morte celular fúngica. Eles são fungicidas e têm um amplo espectro de atividade se comparados aos outros antifúngicos (CAMPOY e ADRIO, 2017).

Os triazólicos atuam sobre o complexo citocromo P450 dos fungos, principalmente inibindo a enzima lanosterol-14- α -demetilase (CYP51), a qual é responsável pela desmetilação do lanosterol, precursor do ergosterol— o esterol predominante na membrana celular fúngica. Com isso, a biosíntese de ergosterol é afetada, e há acumulação do intermediário tóxico (14- α -metilergosta-8,24(28)-dien-6 β , 3 α -diol), o que afeta a integridade da membrana celular fúngica. Também agem modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos. Os derivados triazólicos são, geralmente, fungistáticos contra leveduras e fungicidas contra os fungos filamentosos (XIE *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2017).

As equinocandinas constituem a classe mais recente de antifúngicos desenvolvida e incluem três fármacos: caspofungina, micafungina e anidulafungina. Agem afetando a integridade da parede celular fúngica por inibir a síntese de 1,3- β -D-glucano, um polissacarídeo estrutural que é um dos principais componentes da parede celular fúngica. Por

isso, o bloqueio de sua síntese culmina em desequilíbrio osmótico, prejudicando a viabilidade do fungo (XIE *et al.*, 2014). O espectro antifúngico das equinocandinas engloba, basicamente, *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., sendo inativo contra *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp. e *Trichosporon* spp. (DIOMEDI, 2004; ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016).

Com relação ao manejo terapêutico de tricosporonose invasiva, os fármacos de escolha são os triazólicos, pois apresentam uma melhor resposta clínica. Estudos em modelos animais mostraram que o fluconazol, itraconazol e voriconazol foram eficazes quando em contato com isolados de *Trichosporon* (MARINÉ *et al.*, 2015b). Entretanto, há casos de tricosporonose invasiva em que há falha terapêutica a determinados azólicos, como fluconazol (PEREIRA *et al.*, 2009; DE ALMEIDA JR. E HENNEQUIN, 2016). A anfotericina B (derivado poliênico) também pode ser utilizada, embora tenha sensibilidade variável de acordo com a espécie causadora da infecção (PEREIRA *et al.*, 2009; MARINÉ *et al.*, 2015b; MONTOYA *et al.*, 2018).

Sabe-se que *Trichosporon* spp. exibe resistência intrínseca a equinocandinas e, em determinados casos, tem sensibilidade reduzida à Anfotericina B. Além disso, estudos revelam que, em alguns casos, há ocorrência de resistência, também, a outros fármacos aos quais antes eram sensíveis, como fluconazol e itraconazol, o que evidencia o reduzido arsenal terapêutico para combater infecções causadas por esse fungo (CHAGAS-NETO, 2008; DE ALMEIDA JÚNIOR e HENNEQUIN, 2016). A taxa de mortalidade de pacientes com tricosporonose invasiva e portadores de enfermidade hematológica é em torno de 11%, mesmo fazendo uso de terapia antifúngica (POLVI *et al.*, 2015).

Adicionalmente, quando as células de *Trichosporon* estão associadas em biofilme, nota-se uma diminuição da sensibilidade a todos os antifúngicos administrados, inclusive aos mais eficazes em células planctônicas. Alguns fármacos têm suas CIMs aumentadas em mais de 2.000 vezes o valor com relação às CIMs das células planctônicas (CORDEIRO *et al.*, 2015; MONTOYA *et al.*, 2018). Os mecanismos envolvidos nesse fenômeno de resistência ocorrem, principalmente, em virtude do aumento da densidade celular, presença de células persistentes, efeito protetor da matriz exopolimérica e resistência mediada por bomba de efluxo (RAMAGE *et al.*, 2012; FLEMMING *et al.*, 2016; GABRIELLI *et al.*, 2016).

O crescente uso de antifúngicos, não apenas como tratamento após diagnóstico, mas também como profilaxia, tem promovido uma elevada pressão seletiva sobre as cepas fúngicas, levando ao desenvolvimento de resistência secundária (adquirida) e à seleção de isolados intrinsecamente resistentes. Neste caso, as células mostram resistência antes mesmo

de exposição às drogas, tais como *C. krusei* que apresenta resistência primária ao fluconazol, e *Trichosporon* spp., que mostra resistência primária às equinocandinas (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2015; MONTOYA *et al.*, 2015). Dessa forma, faz-se necessário a pesquisa de novas terapêuticas às comumente utilizadas para se combater tais infecções (FUENTEFRÍA *et al.*, 2017).

2.3 Histonas desacetilases (HDAC)

2.3.1 HDAC

Os microrganismos patogênicos, em sua maioria, desenvolvem mecanismos para se adaptarem às mudanças ambientais e aos estresses celulares decorrentes da interação com as células do hospedeiro (REVIE, *et al.*, 2018). Nesse contexto, o remodelamento da cromatina é um recurso que os seres eucarióticos podem utilizar para direcionar as modificações adaptativas, de maneira rápida, a fim de assegurar sua sobrevivência no hospedeiro (LUGER, DECHASSA e TREMETHICK, 2012; VENKATESH E WORKMA, 2015).

Nas células eucarióticas, o DNA é envolto e compactado por diversas proteínas, dentre elas as histonas, formando uma estrutura básica denominada nucleossomo. O conjunto de nucleossomos forma uma estrutura dinâmica, a cromatina, a qual constantemente pode passar do estado condensado (heterocromatina) para o estado descondensado (eucromatina), como representado na Figura 4 (LUGER *et al.*, 1997; COSTA e PACHECO, 2013). A cromatina em sua conformação aberta (eucromatina) representa o gene transcricionalmente ativo, ao passo que a heterocromatina é inativa transcricionalmente, já que, neste caso, o DNA está mais compactado e enovelado (KOBAYASHI e KIKYO, 2015).

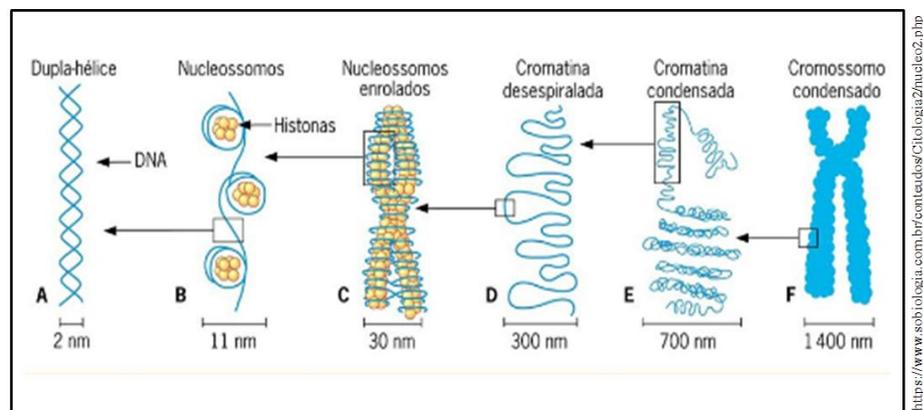


Figura 4. Representação esquemática dos diferentes níveis de condensação do DNA humano. (A) Dupla hélice de DNA; (B) Nucleossomos; (C) Nucleossomos enrolados; (D) Cromatina desespiralizada (eucromatina); (E) Cromatina condensada (heterocromatina); (F) Cromossomo condensado. Fonte: Adaptado do site “Só Biologia” (2018).

As histonas são proteínas alcalinas formadas por cinco subunidades: H1, H2a, H2b, H3 e H4. A subunidade H1 é a mediadora do empacotamento dos nucleossomos, as demais subunidades se unem e ficam dispostas na forma de octâmeros para formar um complexo estável com o DNA (Figura 5), originando os nucleossomos (PRIVALSKY, 2001). Essas proteínas apresentam caudas laterais constituídas de aminoácidos que possuem grupos amino-terminais em resíduos de lisina (Figura 6A). Os grupos amino-terminais podem sofrer processos de acetilação ou desacetilação (Figura 6B), que são reações reversíveis pós-traducionais, levando a uma série de modificações no contexto celular. Tais alterações geram os marcadores epigenéticos, os quais são “códigos de histonas” que influenciam na transcrição dos genes, podendo aumentar ou diminuir sua expressão (VOSS e HAGER, 2014; KOBAYASHI e KIKYO, 2015).

A acetilação de histonas é catalisada pelas enzimas histonas acetiltransferases (HAT), por adição de grupos acetil aos grupos amino-terminais dos resíduos de lisina, neutralizando a carga positiva das histonas e dificultando interação DNA/histona (GIBNEY, 2010). Dessa forma, a cromatina assume a configuração menos condensada e mais livre para a atuação dos fatores de transcrição. Por outro lado, a desacetilação de histonas é catalisada por enzimas chamadas de histonas desacetilases (HDAC), as quais atuam deixando a cromatina mais condensada e, com isso, causando silenciamento gênico com repressão transcricional (HAMILTON, 2011; STRAUSS e REYES-DOMINGUEZ, 2011).

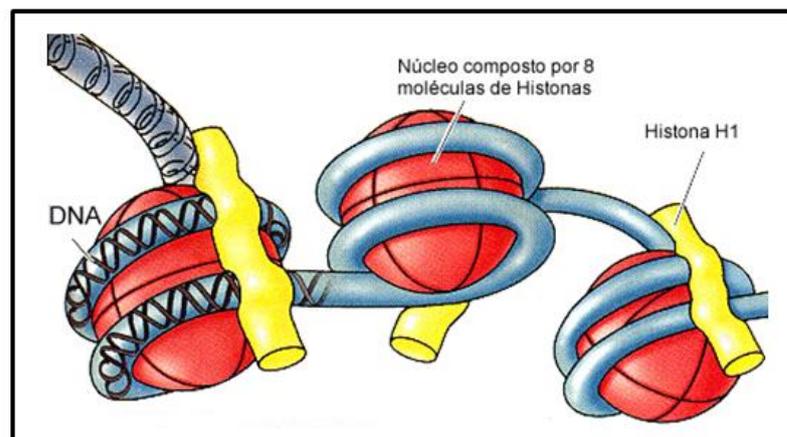


Figura 5: Representação esquemática do DNA envolvendo o octâmero de histonas e formando um complexo estabilizado pela histona H1. Fonte: Adaptado de Purves, Orians, e Heller (2009).

A alternância entre os estados acetilados e desacetilados das histonas é um processo dinâmico (Figura 6C) que promove mudanças na estrutura da cromatina e influencia

diretamente na replicação e no reparo do DNA, ativação ou repressão de genes e progressão do ciclo celular (VOSS e HAGER, 2014). A especificidade dos substratos das HATs e HDACs não se restringe a histonas, mas inclui, também, outras proteínas citoplasmáticas (BROSCH, LOIDL e GRAESSLE, 2008).

Processos epigenéticos que envolvem a atuação de HDACs estão sendo amplamente estudados, tendo em vista que essas enzimas fazem parte de uma família ancestral de enzimas bem conservadas presentes em vegetais, animais, fungos, além de Archea e Bacteria, sendo, assim, uma classe importante de reguladores transcricionais que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento, defesa e adaptação de diversos organismos (HOLLENDER e LIU, 2008; COSTA e PACHECO, 2013).

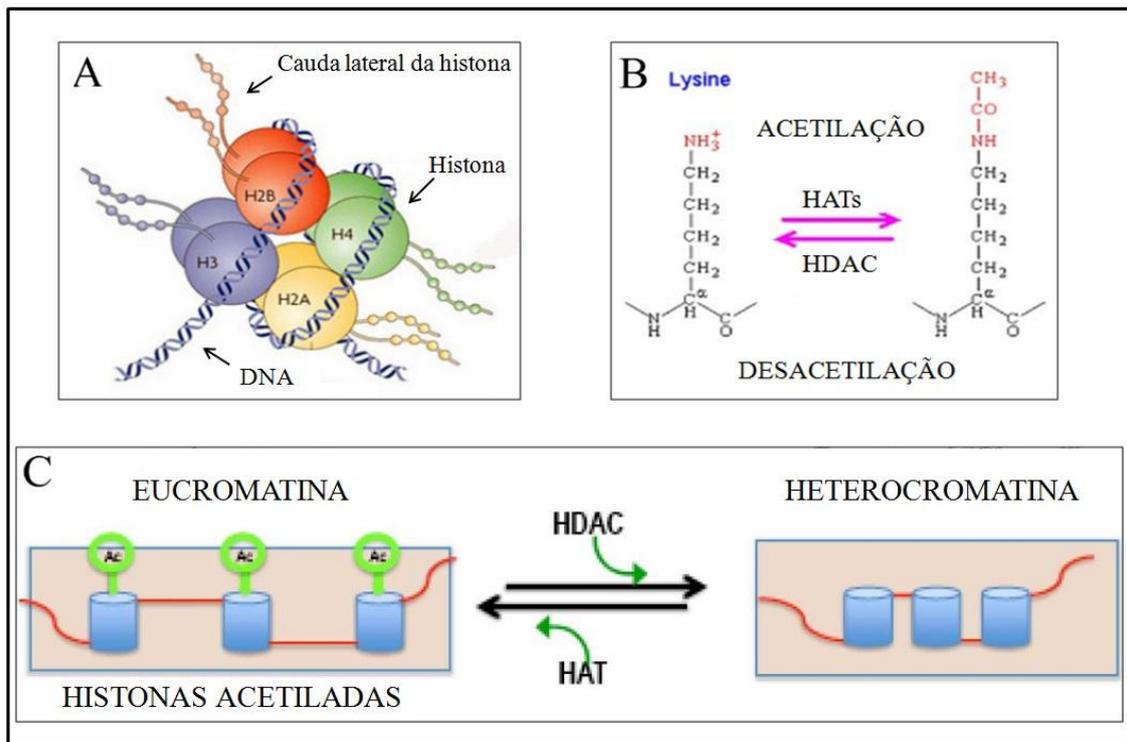


Figura 6: Representação esquemática das histonas com suas caudas laterais com resíduos de lisina, onde há a reação de acetilação e desacetilação. (A) Octâmero de histonas, com suas caudas laterais, envolvido por uma fita de DNA; (B) Reação de acetilação e desacetilação do resíduo de lisina da cauda lateral das histonas; (C) Representação esquemática da eucromatina (transcricionalmente ativa) e da heterocromatina (transcricionalmente inativa), em processo dinâmico de acetilação/desacetilação de histonas. Fonte: Adaptado de Siddiqi, Mills e Matushansky (2010) e Colleparido- Guevara *et al.*, 2015.

2.3.2 HDAC em fungos

O remodelamento da cromatina tem sido relacionado com a regulação da expressão de genes para a produção dos fatores de virulência, com a resistência a antifúngicos e/ou com a resposta a diferenças ambientais em fungos como *Neurospora crassa* (NOLAN *et al.*,

2005), *Schizosaccharomyces pombe* (ZHANG *et al.*, 2013), *Saccharomyces cerevisiae* (IRENE *et al.*, 2016), *Aspergillus fumigatus* (PALMER *et al.*, 2008), *Candida albicans* (LOHSE e JOHNSON, 2010), *Paracoccidioides brasilienses* (OLIVEIRA, 2012) e *Cryptococcus neoformans* (BRANDÃO *et al.*, 2015).

Em *C. albicans*, as HDAC foram relacionadas à transição entre os fenótipos branco-opaco das colônias, adesão às células pulmonares, regulação dos fatores de virulência, morfogênese e resistência a antifúngicos (SMITH e EDLIND, 2002; HNISZ *et al.*, 2010). Em *S. pombe* e *C. albicans*, as HDAC apresentaram papel fundamental na resistência aos antifúngicos por regularem a acetilação da chaperona Hsp90 (ROBBINS, LEACH e COWEN, 2012).

Na levedura *C. neoformans* – principal patógeno oportunista em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana – alterações nos genes da acetilação/desacetilação de histonas afetaram o crescimento desse fungo bem como o desenvolvimento da cápsula, sugerindo que o remodelamento da cromatina pode estar envolvido na regulação da virulência (O'MEARA *et al.*, 2010; BRANDÃO *et al.*, 2015; BRANDÃO *et al.*, 2018).

2.4 Inibidores de histona desacetilases (iHDAC)

2.4.1 iHDAC- aspectos gerais

A regulação dessas enzimas tem sido estudada como reversão terapêutica de alterações epigenéticas associadas a inúmeras patologias humanas. Nesse contexto, estudos mostram que os inibidores de histonas desacetilases (iHDAC) podem ser empregados como terapia adjuvante de diversos tipos de câncer (TOPPER, *et al.*, 2017; SURAWEERA, O'BYRNE e RICHARD, 2018), e de doenças neurológicas (BUONVICINO *et al.*, 2018), mas também têm se destacado em pesquisas envolvendo a regulação da transcrição gênica em microrganismos, dentre eles os fungos (COSTA e PACHECO, 2013; BRANDÃO *et al.*, 2018).

Estudos com *C. albicans* mostraram que iHDAC foram capazes de alterar a morfogênese desse fungo e prejudicar seu crescimento. Além disso, iHDAC afetaram a adesão de *C. albicans* às células do hospedeiro, reduzindo sua patogenicidade e virulência (SIMONETTI *et al.*, 2007; ZACCHI, SCHULZ e DAVIS, 2010). Com relação ao *C. neoformans*, os iHDACs afetaram os principais atributos de virulência do fungo, como: capacidade de crescimento a 37°C, expansão da cápsula polissacarídica, produção de enzima fosfolipase e de melanina e formação de hifas de acasalamento (NGUYEN *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2015).

Brandão e colaboradores (2015), após observarem que o butirato de sódio (inibidor químico de HDACs Classe I) e a tricostatina A (inibidor químico de HDACs Classe II) diminuem a expressão de fenótipos associados à virulência de *C. neoformans*, aprofundaram a pesquisa, fazendo uma investigação genética de HDACs em *C. neoformans* e, em 2018, publicaram resultados demonstrando que HDACs individuais controlam diferentes processos associados à virulência, como termotolerância, síntese de melanina, integridade da parede celular, formação de cápsulas e atividade de protease. Além disso, identificaram que o gene HDAC HDA1 atua como um mediador central controlando diversos processos celulares, como virulência e acasalamento. Por fim, concluíram que o remodelamento da cromatina mediado por HDAC Classe I / II atua diretamente no potencial de virulência e na plasticidade fenotípica de *C. neoformans*(Figura 7)(BRANDÃO *et al.*, 2018).

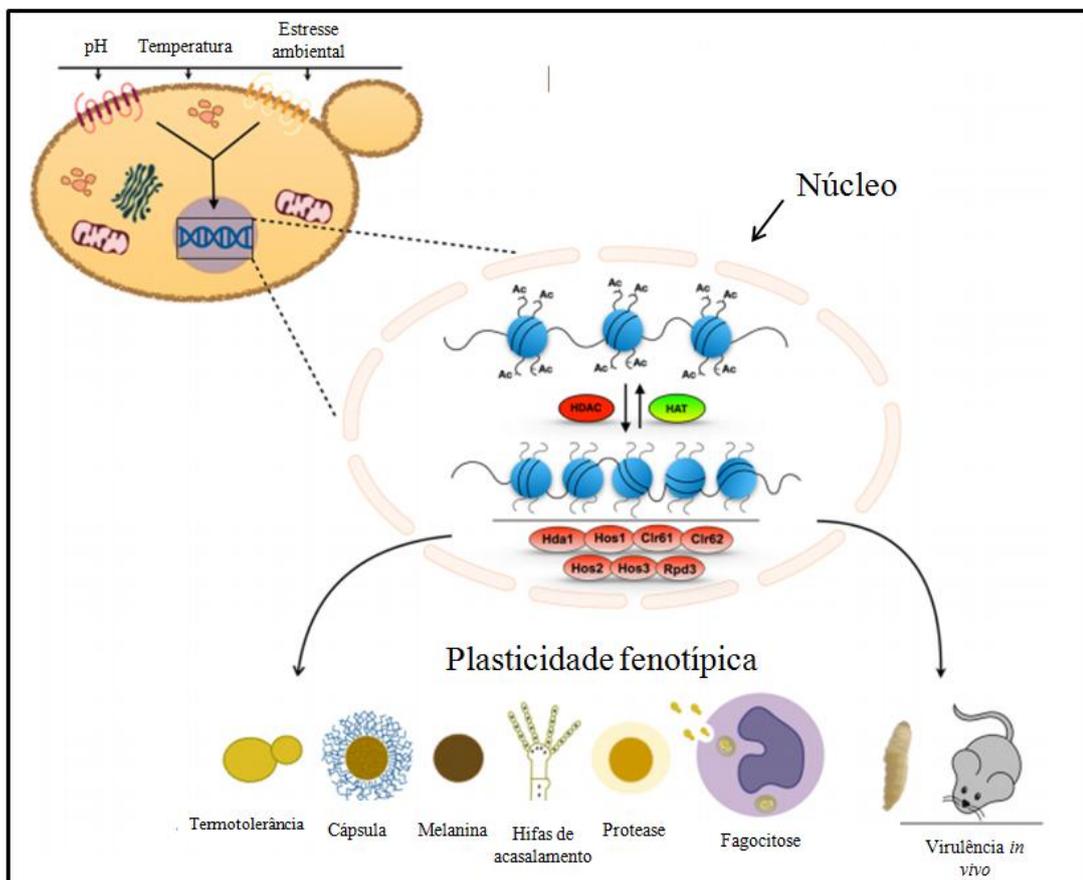


Figura 7: Representação esquemática da regulação de HDAC sobre os principais fenótipos de virulência em *C. neoformans*. As células captam estímulos ambientais (pH, alta temperatura, estresse nutricional, etc.) através de receptores de membrana e um sinal é transmitido para seu interior. O sinal resulta em uma resposta adaptativa que requer remodelamento da cromatina mediado pelo equilíbrio entre a atividade da HAT e HDAC. As enzimas HDAC desempenham importante papel regulatório na expressão de todos os fenótipos de virulência mostrados no esquema. A perda de enzimas HDAC interfere na resposta adaptativa correta aos sinais ambientais e prejudica a expressão dos fatores de virulência. Fonte: Adaptado de Brandão *et al.*, (2018).

Alguns iHDAC também têm a capacidade de agir sinergicamente com diversos antifúngicos, dentre eles os azólicos, que atuam contra vários tipos de leveduras resistentes e fungos filamentosos, o que gera um aumento do espectro de atividade dessas drogas que são utilizadas, também, no tratamento das micoses invasivas (PFALLER *et al* , 2009; NGUYEN *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2015).

2.4.2 Butirato de sódio (ButNa)

Dentre os inibidores de histonas desacetilases utilizados em pesquisas destaca-se o butirato de sódio (ButNa), que é um ácido graxo de cadeia curta (Figura 8), pertencente ao grupo dos ácidos alifáticos e produzido por bactérias anaeróbias do intestino, por meio da fermentação de fibras (MAI e ALTUCCI, 2009). Essa substância foi identificada inicialmente como um iHDAC não específico, e proposto como agente anti-câncer, em virtude da sua capacidade de induzir diferenciação celular (LEDER e LEDER, 1975).

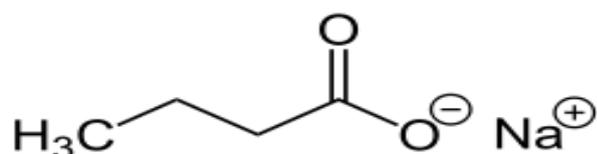


Figura 8: Fórmula estrutural do butirato de sódio. Fonte: A autora (2018).

Detalhes moleculares da ação do ButNa sobre as enzimas histonas desacetilases ainda não foram totalmente elucidados, mas supõe-se que o grupo químico carboxílico atue como um ligante de zinco, ou que compete com o acetato liberado pela reação de desacetilação (MAI e ALTUCCI, 2009). Estudos mostram que o ButNa reduz a expressão de fatores de virulência, bem como afeta o crescimento de fungos patogênicos, podendo ser um recurso futuro para tratar diversas infecções fúngicas (NGUYEN *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2015).

Nguyen *et al.* (2011) estudaram o efeito do butirato de sódio sobre fungos de importância clínica e constataram a inibição, de forma dose-dependente, do crescimento de *C.albicans*, *C.parapsilosis* e *C.neoformans*, bem como o aumento do índice de fagocitose de *C.albicans* e *C.neoformans* por macrófagos peritoniais murinos. Além disso, sobre o *C. neoformans*, houve bloqueio da formação do biofilme, da produção de melanina e da formação da cápsula, assim como efeito sinérgico do butirato de sódio com o fluconazol, aumentando a susceptibilidade do fungo a esta droga.

Posteriormente, Brandão e colaboradores (2015) também comprovaram que o butirato de sódio tem vários efeitos sobre *C. neoformans*, pois prejudicou o crescimento do fungo a 37°C (aproximadamente a temperatura corporal humana), alterou a formação da cápsula, diminuiu a secreção da enzima fosfolipase, reduziu a formação de hifas de acasalamento e afetou a síntese de melanina, propondo que o ButNa pode ser uma substância promissora no tratamento de micoses severas, neste caso a criptococose.

O crescente número de incidência de infecções invasivas causadas por *Trichosporon* spp. associado à alta taxa de letalidade dos pacientes infectados e à resistência dos fungos às terapias convencionais geram a necessidade da pesquisa de novas abordagens terapêuticas às comumente utilizadas. Diante do exposto, o presente estudo se propõe a estudar o efeito, *in vitro*, do ButNa sobre o crescimento, a sensibilidade a antifúngicos e a morfologia de células planctônicas e sésseis de *Trichosporon* spp.

3 HIPÓTESES

- ✓ O butirato de sódio possui atividade antifúngica frente a células planctônicas e sésseis de *T. asahii* e *T. inkin*;
- ✓ O butirato de sódio apresenta sinergismo com drogas antifúngicas, inibindo o crescimento planctônico e de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*;
- ✓ O butirato de sódio altera a morfologia de células planctônicas e sésseis de *T. asahii* e *T. inkin*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar o efeito, *in vitro*, do butirato de sódio sobre o crescimento de células planctônicas e sésseis, bem como sobre a sensibilidade a antifúngicos de cepas clínicas de *Trichosporon asahii* e *T. inkin*.

4.3 Objetivos específicos

- ✓ Analisar o efeito do butirato de sódio sobre o crescimento, *in vitro*, de células planctônicas de *T. asahii* e *T. inkin*;
- ✓ Investigar a ação do butirato de sódio, *in vitro*, sobre a viabilidade metabólica e a biomassa de células sésseis de *T. asahii* e *T. inkin*;
- ✓ Verificar a interação farmacológica do butirato de sódio com antifúngicos clássicos, *in vitro*, frente às células planctônicas e sésseis de *T. asahii* e *T. inkin*;
- ✓ Avaliar a interferência do butirato de sódio sobre a morfologia de células planctônicas e sésseis de *T. asahii* e *T. inkin*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de estudo

O presente estudo foi conduzido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), pertencente ao departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). A análise morfológica dos biofilmes, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foi realizada na Central Analítica do Departamento de Física da UFC.

5.2 Microrganismos

Um total de dez isolados clínicos foram estudados, sendo três cepas de *T. asahii* e sete cepas de *T. inkin*. Abaixo segue a relação das cepas empregadas na pesquisa, bem como suas espécies e origem de isolamento (Tabela 1).

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

Espécie	Cepa	Origem de isolamento
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	Urina
	CEMM 05-6-073	Cateter
	CEMM 03-1-072	Lesão cutânea
<i>T. inkin</i>	CEMM 01-1-143	Lesão cutânea
	CEMM 01-1-144	Lesão cutânea
	CEMM 01-1-145	Urina
	CEMM 05-6-057	<i>Piedra</i> branca
	CEMM 05-6-074	Urina
	CEMM 05-6-075	Área perigenital
	CEMM 03-1-073	Unhas
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	Fezes

ATCC: *American Type Culture Collection*. CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica.

As cepas utilizadas pertencem à coleção de cultura do CEMM-UFC. A identificação das cepas foi baseada na análise de características micromorfológicas em ágar malte

(Himedia[®], Brasil) (DE HOOG *et al.*, 2000) e sequenciamento da região intergênica IG1 do rDNA, usando *primers* 26SF e 5SR (MESSIAS SILVESTRE *et al.*, 2010). Os microrganismos foram recuperados dos estoques por meio de repiques em ágar batata dextrose (Himedia[®], Brasil) e incubação a 35 °C durante 48 h.

5.3 Desenho experimental

Este trabalho foi realizado de acordo com a sequência dos procedimentos representados no organograma da Figura 9. Todos os experimentos foram realizados *in vitro*. Primeiramente, por meio do teste de sensibilidade (item 5.5), avaliou-se o efeito do ButNa sobre o crescimento de células planctônicas de *Trichosporon* spp., a fim de se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ButNa para cada cepa utilizada. Tendo-se esses resultados, testou-se a interação entre o ButNa com drogas antifúngicas de uso clínico (item 5.6).

Decorridos esses experimentos, analisou-se a atividade do ButNa sobre a adesão (item 5.7.1), desenvolvimento (item 5.7.2) e maturação de biofilmes (item 5.7.3) de cepas clínicas de *Trichosporon* spp., em concentrações MIC e 10x MIC das células planctônicas previamente testadas. Em seguida, utilizou-se uma cepa representativa de cada espécie e fez-se o ensaio de interação entre o ButNa e antifúngicos clássicos (item 5.8), para determinar se o ButNa potencializa o efeito dessas drogas ante biofilmes (na fase de adesão, desenvolvimento e maturação) os quais são conhecidamente menos responsivos aos tratamentos utilizados. Avaliou-se, também, a atividade do ButNa sobre a morfologia de *Trichosporon* spp., em células planctônicas, por meio do ensaio de filamentação (item 5.9), e em biofilme, por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV (item 5.10) e Microscopia Confocal (item 5.11).

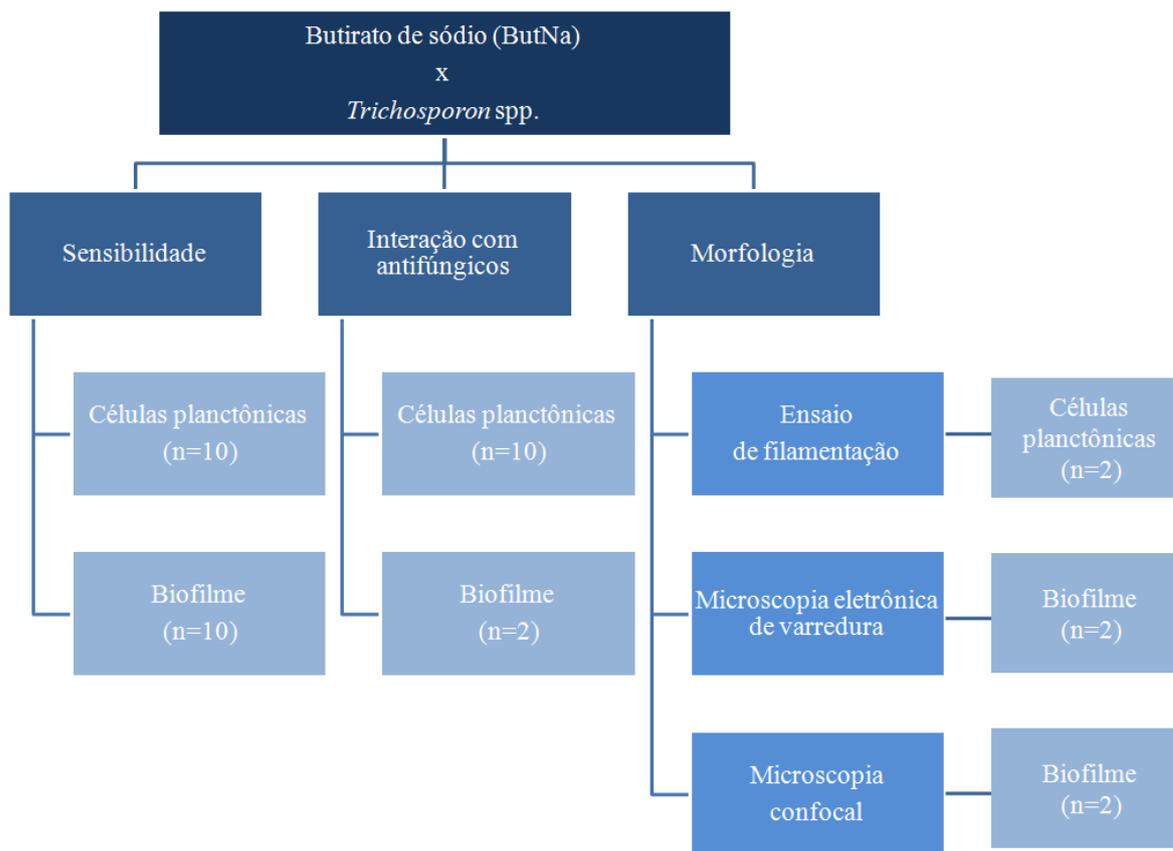


Figura 9. Organograma das principais etapas experimentais do estudo. A quantidade de cepas utilizadas em cada experimento está representada entre parênteses.

5.4 Drogas

Soluções-estoque de anfotericina B (AMB; Sigma Chemical Corporation, EUA), fluconazol (FLC; Pfizer, São Paulo, Brasil), voriconazol (VRC; Pfizer, EUA) e caspofungina (CAS, Sigma Chemical Corporation, EUA) foram preparadas de acordo com o documento M27-S4 padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e suas soluções-estoque foram diluídas em DMSO a 100% (CLSI, 2012). A solução-estoque do butirato de sódio (ButNa, Sigma Chemical Corporation, EUA) foi preparada em água destilada, na concentração 2000 mM, esterilizada por filtração e armazenada a -20°C . Durante cada experimento, foram feitas diluições em série de cada fármaco em meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Corporation, EUA), tamponado a pH 7,0 com 0,165 M MOPS (Sigma Chemical Corporation, EUA).

5.5 Teste de sensibilidade planctônica

O teste de sensibilidade para células planctônicas foi realizado de acordo com o método de microdiluição em caldo, conforme o documento M27-A3 (CLSI, 2008). Cepas de *Trichosporon* ($n = 10$) foram previamente cultivadas em ágar batata dextrose (Himedia[®],

Índia) a 35 °C por 48 h. Colônias individuais foram suspensas em 5 ml de solução salina estéril a 0,9%, e a turvação foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente, a suspensão foi diluída a 1:50 e depois 1:20 com RPMI 1640, resultando em um inóculo de células planctônicas contendo aproximadamente $0,5-2,5 \times 10^3$ células/mL. Os testes de sensibilidade foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços (CLSI, 2008).

Antifúngicos (AMB, VRC e FLC) foram utilizados como controles para o teste de sensibilidade ao ButNa e nos testes de interação com ButNa. CAS foi utilizada em testes de interação com o ButNa. Cada droga foi testada nas seguintes concentrações: 0,0313 – 16 µg/mL para AMB e VRC; 0,125 – 64 µg/mL para FLC; 0,01625–8µg/mL para CAS, conforme as concentrações preconizadas pelo documento citado anteriormente, e 7,5 a 240 mM para ButNa, conforme Brandão *et al.*, (2015) e Nguyen *et al.* (2011).

As placas foram incubadas a 35 °C e o crescimento fúngico lido visualmente após 48 horas. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas de acordo com as diretrizes do CLSI. Para a AMB, a CIM foi definida como a menor concentração de fármaco que causou inibição completa do crescimento (CIM 100); para os azólicos, as CIMs corresponderam à concentração visualmente mais baixa com 50% de inibição do crescimento (CIM50), quando comparadas com o controle do crescimento sem fármacos (CLSI, 2008).

Para ButNa, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico visível (CIM50). Os isolados foram testados em triplicata. Os controles foram cultivados em meio RPMI sem antifúngicos. *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi usada como controle de qualidade dos testes (CLSI, 2008).

5.6 Teste de interação farmacológica com antifúngicos

Para a análise da interação entre os antifúngicos e o ButNa, foi aplicada a metodologia de *Checkerboard* (tabuleiro de xadrez) com adaptações (ODDS, 2003; CORDEIRO *et al.*, 2016). Para cada cepa testada, foram combinadas as CIM correspondentes de todos os antifúngicos e o ButNa. A concentração inibitória mínima de cada combinação (CIMsin) foi definida como as menores concentrações de cada droga em combinação capazes de causar redução do crescimento fúngico ($\geq 50\%$) para os azólicos e 100% para AMB (NOONEY; MATTHEWS; BURNIE, 2005; NGUYEN *et al.*, 2011).

Em seguida, para avaliar a interação entre os compostos, foi feito o cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF), definido pela soma das Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIF) para cada antifúngico, o qual é referente à relação entre a CIM

de cada antifúngico combinado com o ButNa ($CIM_{a,b}$) pela CIM do mesmo antifúngico testado isoladamente (CIM_a ou CIM_b), como mostrado na fórmula a seguir:

$$ICIF = \frac{CIM_{a,b}}{CIM_a} + \frac{CIM_{a,b}}{CIM_b}$$

Os seguintes parâmetros foram considerados: $ICIF \leq 0,5$: Sinergismo; $0,5 < ICIF < 4,0$: Sem interação e $ICIF > 4,0$: Antagonismo (ODDS, 2003).

5.7 Teste de sensibilidade em biofilme

5.7.1 Efeito do ButNa sobre a adesão celular

Os biofilmes foram formados como descrito por Cordeiro *et al.* (2015). Cepas de *T. inkin* ($n = 7$) e *T. asahii* ($n = 3$) foram previamente cultivadas em ágar batata dextrose a 35 °C por 48h. Decorrido esse tempo, fez-se uma suspensão das células em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS, previamente ajustado o pH para 7,0, até atingir a turbidez correspondente à escala 0,5 de McFarland ($2,5 \times 10^6$ cels. ml^{-1}). Alíquotas de 100 μL de cada suspensão foram transferidas para microplacas (material poliestireno) de 96 poços de fundo chato, contendo 100 μL do ButNa nas concentrações CIM e 10xCIM planctônico. Para controle de crescimento fúngico, alíquotas de 100 μL de cada suspensão foram transferidas para poços contendo 100 μL de RPMI sem droga. As microplacas foram incubadas a 35°C por 6 h, sob agitação de 80 rpm (CORDEIRO *et al.*, 2015). Todos os testes foram feitos em triplicata.

Decorrido esse tempo, o qual corresponde à adesão celular, os sobrenadantes foram descartados, e os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween estéril (tampão fosfato com Tween 20 a 0,05%) para a remoção das células não aderidas (CORDEIRO *et al.*, 2015). Em seguida, avaliou-se a atividade metabólica utilizando o 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H- hidróxido de tetrazólio (XTT), método colorimétrico para viabilidade (CORDEIRO *et al.* 2015). A biomassa nesta fase não foi analisada, porque seu valor muito ínfimo, podendo ser desconsiderado, enquanto as células estão começando a aderir à placa.

5.7.2 Efeito do ButNa sobre o desenvolvimento do biofilme

Os biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* foram formados segundo Cordeiro *et al.* (2015). Após se fazer o inóculo conforme descrito no item 5.7.1, colocou-se 100 μL de cada

suspensão fúngica nas microplacas de 96 poços de fundo chato contendo 100 µL de RPMI e incubou-se a 35°C por 6 h, sob agitação de 80 rpm. Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados, e os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween 20 (0,05% v/v) para a remoção das células não aderidas. Em seguida, alíquotas de 200 µL do ButNa nas mesmas concentrações descritas anteriormente (CIM e 10xCIM) foram adicionadas aos biofilmes aderidos na placa. Nos poços de controle de crescimento fúngico, foram adicionados apenas 200 µL RPMI sem droga. As microplacas foram incubadas a 35°C por 48 h, sob agitação de 80 rpm. (CORDEIRO *et al.*, 2015). Todos os testes foram feitos em triplicata. Decorrido desse tempo, os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween 20 e analisados quanto à viabilidade metabólica (ensaio XTT) e biomassa (coloração de cristal violeta), como descrito no item 5.7.1.

5.7.3 Efeito do ButNa sobre biofilme maduro

Os biofilmes foram formados como descrito anteriormente e incubados a 35 °C por 48h. Após esse tempo, os biofilmes maduros foram lavados duas vezes com PBS-Tween 20 (0,05% v/v). Alíquotas de 200 µL do ButNa nas mesmas concentrações descritas anteriormente (CIM e 10xCIM) foram adicionadas, e as placas foram incubadas a 35°C por 48h, sob agitação de 80 rpm. Células livres de antifúngicos foram incluídas como controles para cada condição de teste. As análises foram realizadas pelo ensaio de redução de XTT para análise da viabilidade metabólica e por coloração de cristal violeta para quantificação da biomassa (CORDEIRO *et al.*, 2015). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.8 Teste de interação farmacológica com antifúngicos em biofilme

Para as análises, foi empregada uma cepa representativa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma de *T. inkin* (CEMM 05-6-074). No procedimento experimental, utilizou-se o ButNa (CIM) sozinho e combinado com os antifúngicos AMB, FLC, VOR e CAS, todos na concentração do CIM planctônico previamente obtidos em testes anteriores. Também avaliou-se as drogas antifúngicas sozinhas (CIM) contra os biofilmes em suas diferentes fases, bem como células livres de antifúngicos foram incluídas como controles para cada condição de teste.

5.8.1 Efeito do ButNa combinado com antifúngicos na adesão do biofilme

Os biofilmes foram formados de acordo com Cordeiro *et al.* (2015) como descrito no item 5.7.1. O ButNa bem como os antifúngicos (AMB, FLC, VRC e CAS) foram adicionados

sozinhos ou combinados, todos nas concentração inibitória mínima planctônica, às suspensões fúngicas ($2,5 \times 10^6$ cels. ml^{-1}), e as placas foram incubadas a 35°C por 6 h, sob agitação de 80 rpm. Decorrido esse tempo, o qual corresponde à adesão celular, os sobrenadantes foram descartados, e os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween estéril para a remoção das células não aderidas (CORDEIRO *et al.*, 2015). Em seguida, avaliou-se a atividade metabólica utilizando ensaio do XTT. Células livres de antifúngicos foram incluídas como controles para cada condição de teste. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (CORDEIRO *et al.*, 2015).

5.8.2 Efeito do ButNa combinado com antifúngicos no desenvolvimento do biofilme

Os biofilmes foram formados de acordo com Cordeiro *et al.* (2015) como descrito no item 5.7.2. Decorridas as 6h do tempo de adesão, os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS-Tween 20 (0,05% v/v). O ButNa bem como os antifúngicos (AMB, FLC, VRC e CAS) foram adicionados sozinhos ou combinados, todos nas concentração inibitória mínima planctônica, aos biofilmes, e as placas foram incubadas a 35°C por 48h, sob agitação de 80 rpm. Células livres de antifúngicos foram incluídas como controles para cada condição de teste. As análises foram realizadas pelo ensaio de redução de XTT para análise da viabilidade metabólica e por coloração de cristal violeta para quantificação da biomassa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (CORDEIRO *et al.*, 2015).

5.8.3 Efeito do ButNa combinado com antifúngicos em biofilme maduro

Os biofilmes foram formados como descrito previamente, de acordo com Cordeiro *et al.* (2015), no ítem 5.7.3. Decorridas as 48h, tempo necessário para a maturação dos biofilmes de *Trichosporon* spp., os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween 20 (0,05% v/v). O ButNa bem como os antifúngicos (AMB, FLC, VRC e CAS) foram adicionados sozinhos ou combinados, todos nas concentração inibitória mínima planctônica, aos biofilmes, e as placas foram incubadas a 35°C por 48h, sob agitação de 80 rpm. Células livres de antifúngicos foram incluídas como controles para cada condição de teste. As análises foram realizadas pelo ensaio de redução de XTT para análise da viabilidade metabólica e por coloração de cristal violeta para quantificação da biomassa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (CORDEIRO *et al.*, 2015).

5.9 Ensaio de filamentação

A análise do efeito do ButNa na morfologia de *Trichosporon* spp., através da inibição do desenvolvimento de hifas, foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Morais-Braga *et al.* (2017), com adaptações. Utilizou-se uma cepa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma cepa de *T. inkin* (CEMM 05-6-074). Inicialmente, uma solução estoque de ButNa (2000mM) foi diluída em placas contendo 11 mL de meio ágar malte fundido, obtendo-se uma concentração final de CIM (120 mM) e 2x CIM (250 mM). Um controle para o crescimento de leveduras (em ágar malte livre de droga) foi realizado. Em seguida, fez-se o microcultivo de fungos filamentosos, segundo Sidrim e Rocha (2004). As placas foram colocadas à temperatura ambiente durante sete dias. Decorrido esse tempo, lâminas com corante azul de algodão lactofenol foram feitas e analisadas sob um microscópio de luz, utilizando-se uma objetiva de 40x. Uma câmera foi anexada ao microscópio para capturar imagens de dez campos para cada condição. Posteriormente, uma prancha de imagens foi montada para comparação das condições com os respectivos controles das cepas representativas do teste.

5.10 Microscopia eletrônica de varredura

A caracterização do efeito do ButNa sobre a ultraestrutura dos biofilmes foi realizada por meio de análise de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV – de acordo com Cordeiro *et al.* (2015) e Di Bonaventura *et al.* (2006). Utilizou-se uma cepa representativa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma cepa de *T. inkin* (CEMM 05-6-074). Foram realizados controles para cada cepa em meio livre de ButNa. Biofilmes maduros foram formados em lâminas Thermanox® em uma placa de poliestireno de 12 poços. Após o período de incubação com ButNa (CIM e 10xCIM), os biofilmes foram fixados com Glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M (pH 7,4), com 0,1% de corante azul de alcian, e incubados *overnight* a 4 °C. Em seguida, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato 0,15 M e desidratados sequencialmente com 50, 70, 80, 95 e 100%, por 10 minutos, duas vezes cada. Posteriormente, os biofilmes foram desidratados com hexametildissilazano por 30 minutos e as lâminas foram secadas por 24 h. As lâminas foram cobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em um microscópio eletrônico de varredura FEI Inspect S50, em alto vácuo a 15 kV. O processamento da imagem foi realizado utilizando o software Photoscape v3.6.5 (MooiiTech, Korea).

5.11 Microscopia confocal de varredura a laser

Para avaliar o efeito do ButNa na viabilidade e ultraestrutura de *Trichosporon* spp., os biofilmes foram avaliados utilizando Microscopia Confocal de Varredura a Laser - MCVL (DI BONAVENTURA *et al.*, 2006). Utilizou-se uma cepa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma cepa de *T. inkin* (CEMM 05-6-074). Foram realizados controles para cada cepa em meio livre de ButNa. Alíquotas do corante Live / Dead (Invitrogen, EUA) foram adicionadas aos biofilmes e posteriormente observadas em microscópio confocal Nikon C2, com comprimento de onda de 488 nm para detecção de corante Syto9, que identifica células viáveis, e a 561 nm para a detecção de iodeto de propídio, que identifica células não viáveis. Para análise das imagens, foram escolhidos cinco campos a partir das imagens tridimensionais do biofilme, e a quantificação colorimétrica, assim como a mensuração do *Z-slice* foram realizadas utilizando o software ImageJ 1.50i (COLLINS, 2007).

5.12 Análise estatística

Os dados paramétricos foram avaliados por teste de variância ANOVA e pós-teste de Bonferroni. O teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn foram aplicados para dados não paramétricos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo para todas as avaliações. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism[®] 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6 RESULTADOS

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

A sensibilidade das células planctônicas de *T. asahii*(n=3) e *T. inkin*(n=7) ao ButNa, AMB, FLC e VRC está descrita na Tabela 2. Observou-se que o butirato de sódio diminuiu o crescimento planctônico visível das cepas clínicas de *Trichosporon* spp. em 50% com relação ao controle, em concentrações variando de 60 mM a 120 mM. A CIM da AMB variou de 0,25 a 2 µg/mL, enquanto a CIM do FLC variou de 1 a 4 µg/mL e a CIM do VRC de 0,0312 a 0,125 µg/mL para as cepas de *Trichosporon* spp. analisadas.

Tabela 2. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Trichosporon asahii* e *T. inkin* frente ao butirato de sódio (ButNa), anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC) e voriconazol (VRC).

Espécies	Cepas	CIM			
		ButNa (mM)	AMB (µg/mL)	FLC (µg/mL)	VRC (µg/mL)
		50%*			
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	120	0,25	4	0,125
	CEMM 05-6-073	60	1	2	0,0625
	CEMM 03-1-072	60	2	1	0,0312
<i>T. inkin</i>	CEMM 01-1-143	60	0,25	4	0,0312
	CEMM 01-1-144	120	0,5	2	0,0312
	CEMM 01-1-145	120	0,25	4	0,0625
	CEMM 05-6-057	60	1	1	0,0312
	CEMM 05-6-074	120	0,25	2	0,0312
	CEMM 05-6-075	60	0,5	2	0,0312
	CEMM 03-1-073	60	0,5	2	0,0312

* 50% inibição do crescimento visível. CIM = Concentração Inibitória Mínima.

6.2 Interação do ButNa com antifúngicos frente a células planctônicas de *T. asahii* e *T. inkin*

Após a determinação dos valores de CIM para as drogas testadas, avaliou-se o efeito do ButNa em combinação com AMB, FLC e VRC frente a células planctônicas de *T. asahii*(3)

e *T. inkin*(7). OButNa em combinação com a AMB foi sinérgico em duas das dez cepas testadas, sendo uma *T. asahii* e uma *T. inkin*. A combinação do ButNa com o FLC apresentou sinergismo em cinco das dez cepas testadas, todas da espécie *T. inkin*. OVRC apresentou sinergismo com o ButNa em três das dez cepas testadas, sendo duas *T. asahii* e uma *T. inkin*. Os demais resultados foram indiferentes, não foi observado antagonismo (Tabela 3).

Tabela 3. Interação do butirato de sódio (ButNa) com os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC) e voriconazol(VRC) frente às células planctônicas de *Trichosporon asahii* e *T. inkin*.

Espécies (n)	Combinação	CIM		ICIF	Sinergismo (n)
		ButNa (mM)	Antifúngicos (µg/ml)		
<i>T. asahii</i> (3)	ButNa + AMB	15-30	0,125-0,5	0,375-0,75	1
	ButNa + FLC	15-30	0,5-2	0,75	0
	ButNa + VRC	15-30	0,015-0,031	0,49-0,75	2
<i>T. inkin</i> (7)	ButNa + AMB	15-30	0,25-0,5	0,5-2,25	1
	ButNa + FLC	15-30	0,062-2	0,313-1,25	5
	ButNa + VRC	15-30	0,008-0,062	0,5-2,25	1

ICIF= Índice da Concentração Inibitória Fracionária. CIM = Concentração Inibitória Mínima.

6.3 Efeito do ButNa sobre biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

Os resultados obtidos para as cepas de *T. asahii*(3) e *T. inkin*(7) foram representados através das médias das diminuições da atividade metabólica e da biomassa após exposição dos biofilmes ao ButNa, tomando-se como 100% de crescimento o controle com inóculo em RPMI (sem a droga). Na fase de adesão, houve uma redução da atividade metabólica de, em média, 10% (CIM) e 45% (10xCIM). Na etapa de formação, o declínio da atividade metabólica foi de 25% (CIM) e 63% (10xCIM). Também nessa fase, houve diminuição da biomassa em 45% (CIM) e 81% (10xCIM). Em biofilme maduro, observou-se um decréscimo de 18% da atividade metabólica (CIM) e de 48% (10xCIM), bem como redução da biomassa em 51% (CIM) e 77% (10xCIM). Os resultados estão representados na forma de gráficos na Figura 10.

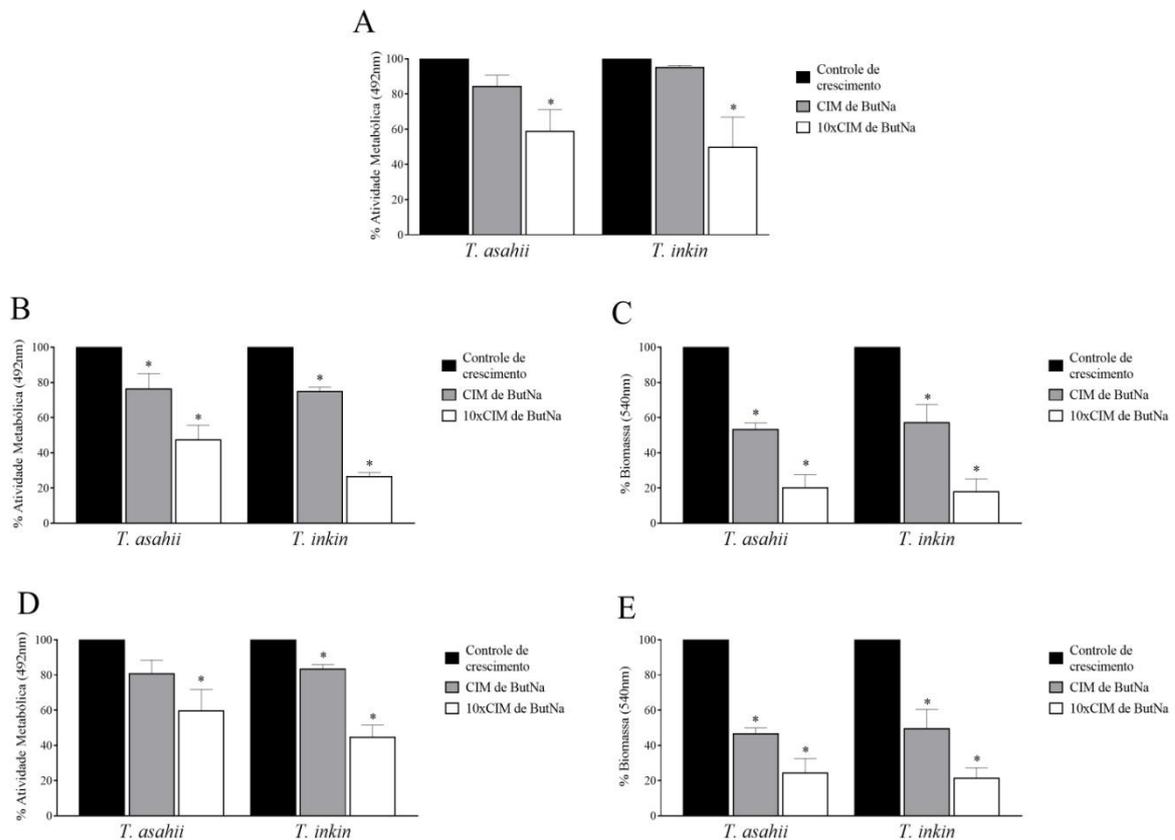


Figura 10. Efeito do ButNa sobre a atividade metabólica e a biomassa de biofilmes de *T. asahii*(n=3) e *T. inkin*(n=7), expressos como porcentagens relativas da absorbância do ensaio de redução de XTT (A, C e E) e coloração com cristal violeta (B, D e F), respectivamente. (A e B) Adesão de células de *Trichosporon* spp. após incubação por 6 h com ButNa. (C e D) Biofilme em desenvolvimento (em contato com o ButNa após 6 h de crescimento). (E) Biofilme maduro (em contato com o ButNa após 48 h de crescimento). Barras negras representam controle de crescimento livre de drogas; barras cinza representam células expostas à CIM do ButNa e barras brancas representam biofilmes expostos a 10×CIM do ButNa. * Diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle de crescimento livre de drogas ($p < 0,05$).

6.4 Interação do ButNa com antifúngicos frente a células sésseis de *T. asahii* e *T. inkin*

6.4.1 Efeito da interação do ButNa com antifúngicos na adesão celular

Testou-se a sensibilidade de uma cepa representativa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma de *T. inkin* (CEMM 05-6-074) ao ButNa, aos antifúngicos AMB, FLC, VRC e CAS, bem como aos antifúngicos combinados com o ButNa. Observou-se que o ButNa melhorou significativamente o desempenho da AMB (Figura 11A), do VRC (Figura 11-C) e da CAS (Figura 11D), dificultando a adesão das células à placa e consequente formação do biofilme, como pode ser observado nos gráficos da figura 11.

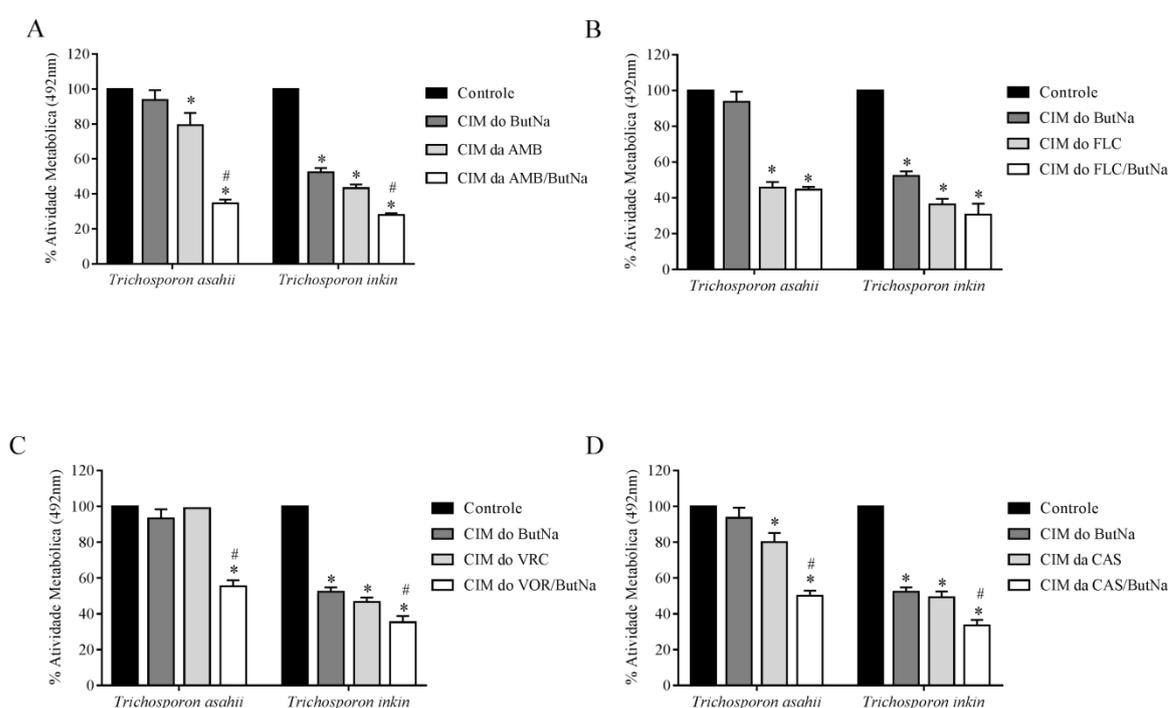


Figura 11. Efeito do ButNa combinado com antifúngicos na adesão celular de cepas *T. asahii*CEMM 05-6-072 (n=1) e *T. inkin* CEMM 05-6-074 (n=1), expresso como porcentagens relativas da absorvância do ensaio de redução de XTT, indicando redução da atividade metabólica. (A) ButNa combinado com AMB. (B) ButNa combinado com FLC. (C) ButNa combinado com VRC. (D) ButNa combinado com CAS. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; barras cinza-escuras representam células expostas à CIM do ButNa; barras cinza-claras representam células expostas à CIM dos antifúngicos e barras brancas representam as células expostas à CIM da combinação ButNa/ATF. * Diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle de crescimento livre de drogas ($p < 0,05$). # Diferenças estatisticamente significantes, quando comparado o ATF sozinho com a combinação ButNa/ATF ($p < 0,05$).

6.4.2 Efeito da interação do ButNa com antifúngicos no desenvolvimento do biofilme

Observou-se que o ButNa melhorou significativamente o desempenho da AMB na redução da atividade metabólica do biofilme de *T. asahii* CEMM 05-6-072 (Figura 12A). Em combinação com o FLC, o ButNa reduziu significativamente a atividade metabólica e a biomassa de *T. asahii*CEMM 05-6-072 (Figura 12C-D). ButNa combinado com o VRC melhorou significativamente o desempenho do antifúngico contra as cepas testadas (Figura 12E-F). A combinação ButNa com CAS reduziu a atividade metabólica do biofilme de *T. inkin*CEMM 05-6-074 (Figura 12G).

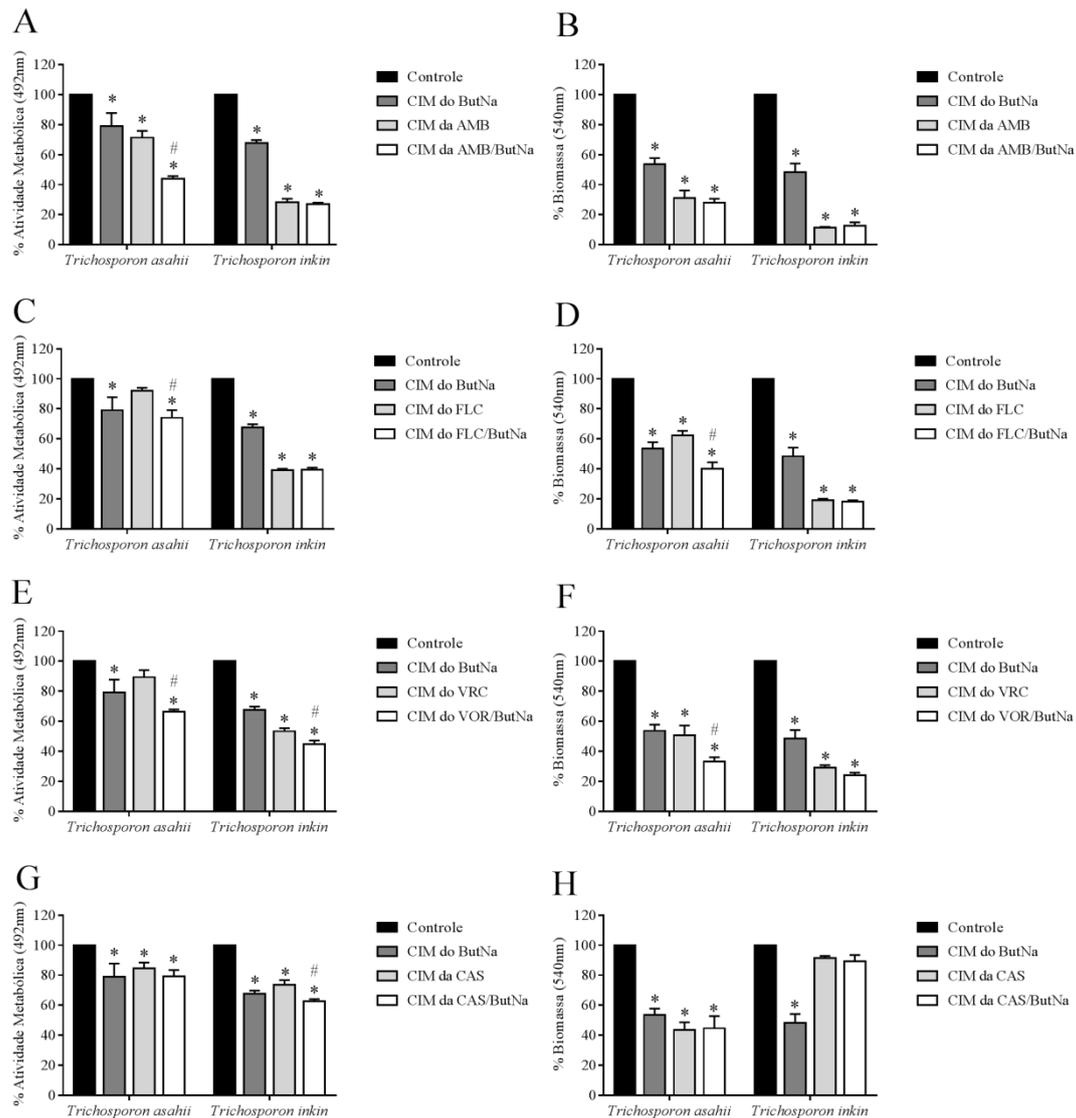


Figura 12. Efeito do ButNa combinado com antifúngicos no desenvolvimento do biofilme de cepas de *T. asahii* CEMM 05-6-072 (n=1) e *T. inkin* CEMM 05-6-074 (n=1), expresso como porcentagens relativas da absorbância do ensaio de redução de XTT (A, C, E e G) e coloração com cristal violeta (B, D, F e H), respectivamente. (A e B) ButNa combinado com AMB. (C e D) ButNa combinado com FLC. (E e F) ButNa combinado com VRC. (G e H) ButNa combinado com CAS. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; barras cinza-escuras representam biofilmes expostos à CIM do ButNa; barras cinza-claras representam biofilmes expostos à CIM dos antifúngicos e barras brancas representam biofilmes expostos à CIM da combinação ButNa/ATF. * Diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle de crescimento livre de drogas ($p < 0,05$). # Diferenças estatisticamente significantes, quando comparado o ATF sozinho com a combinação ButNa/ATF ($p < 0,05$).

6.4.3 Efeito da interação do ButNa com antifúngicos no biofilme maduro

Os testes foram realizados como expresso anteriormente, porém avaliando-se a combinação do butirato de sódio com antifúngicos em biofilmes maduros. Observou-se que o ButNa melhorou significativamente o desempenho da AMB na redução da biomassa do biofilme de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-072 (Figura 13B), mas não apresentou redução na atividade metabólica dos biofilmes das cepas citadas. O mesmo ocorreu na combinação FLC/ButNa (figura 13D) e CAS/ButNa (Figura 13H). ButNa combinado com o VRC diminuiu significativamente a biomassa de *T. asahii* CEMM 05-6-072 (Figura 13F), mas não apresentou efeito significativo na redução da atividade metabólica do biofilme maduro das cepas testadas. Os resultados estão expressos nos gráficos da figura 13.

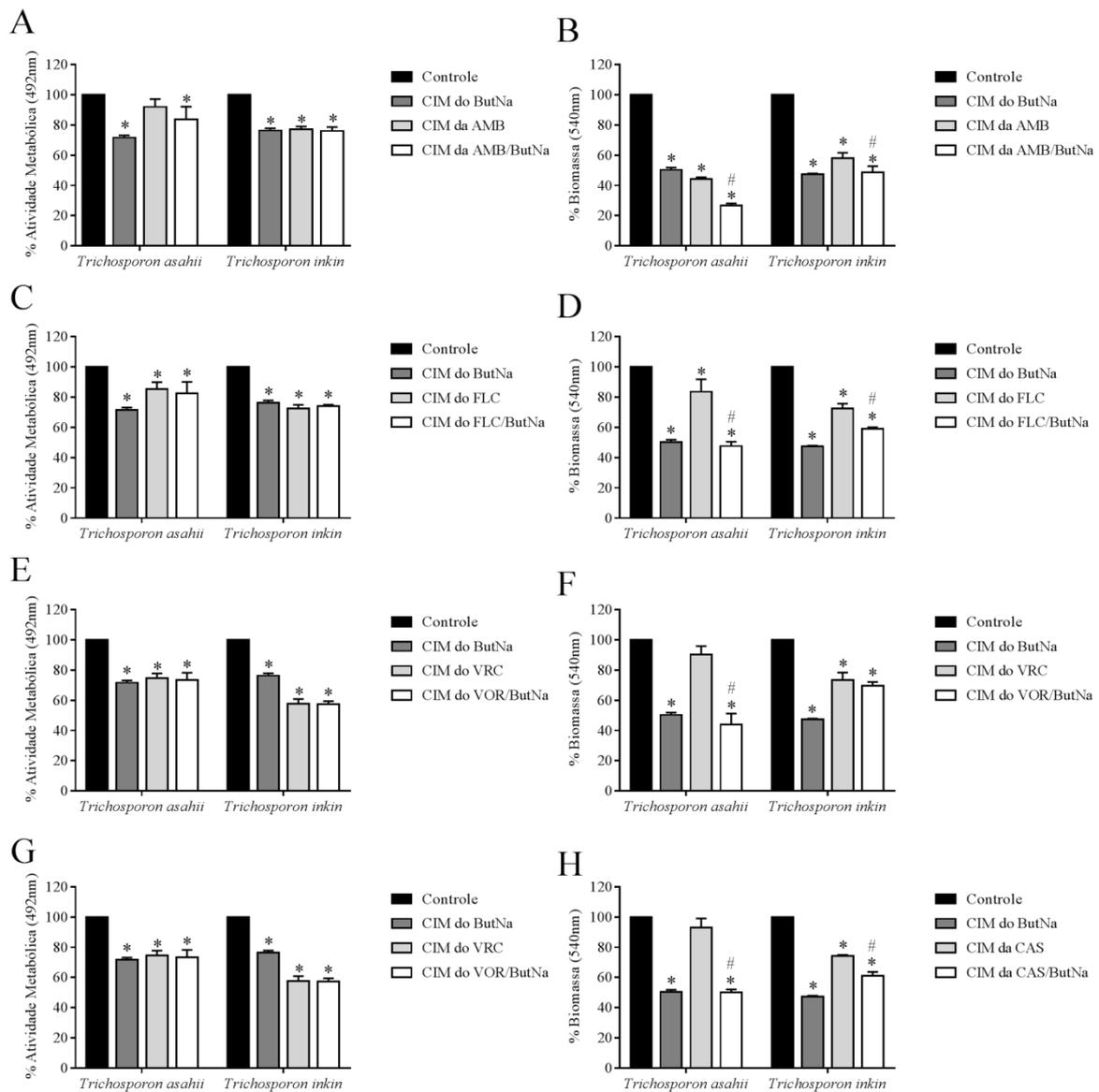


Figura 13. Efeito do ButNa combinado com antifúngicos em biofilmes maduros de cepas de *T. asahii*CEMM 05-6-072 (n=1) e *T. inkin* CEMM 05-6-074 (n=1), expresso como porcentagens relativas da absorbância do ensaio de redução de XTT (A, C, E e G) e coloração com cristal violeta (B, D, F e H), respectivamente. (A e B) ButNa combinado com AMB. (C e D) ButNa combinado com FLC. (E e F) ButNa combinado com VRC. (G e H) ButNa combinado com CAS. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; barras cinza-escuras representam biofilmes expostos à CIM do ButNa; barras cinza-claras representam biofilmes expostos à CIM dos antifúngicos e barras brancas representam biofilmes expostos à CIM da combinação ButNa/ATF. * Diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle de crescimento livre de drogas ($p < 0,05$). # Diferenças estatisticamente significantes, quando comparado o ATF sozinho com a combinação ButNa/ATF ($p < 0,05$).

6.5 Efeito do ButNa na micromorfologia de *T. asahii* e *T. inkin*

Cepas de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074) foram submetidas a um ambiente pobre em nutrientes e com baixa saturação de oxigênio, com o objetivo de estressar o fungo, estimulando seu potencial de filamentação. Para testar a capacidade do ButNa em interferir na transição morfológica de leveduras para hifas, adicionou-se ao meio de cultivo o ButNa na concentração CIM e 2xCIM e fez-se microcultivos. A análise mostrou que ButNa reduziu a filamentação de *T. asahii* (CEMM 05-6-072), já que observa-se que, no controle de crescimento do fungo em meio de cultura sem adição do ButNa, há maior quantidade de hifas hialinas contínuas (Figura 14A), enquanto que, essa mesma cepa exposta ao ButNa (CIM) apresenta hifas quebradas e blastoconídeos (Figura 14C), e, quando exposta ao ButNa (CIM) apresentaram menor densidade celular, com presença de blastoconídeos e artroconídeos (figura 14E). A cepa de *T. inkin* (CEMM 05-6-074), quando exposta ao ButNa (CIM) e ao ButNa (2xCIM) – Figura 14D e 14F, respectivamente – apresentou hifas mais finas e com presença de vacúolos, sugerindo processo de degradação celular.

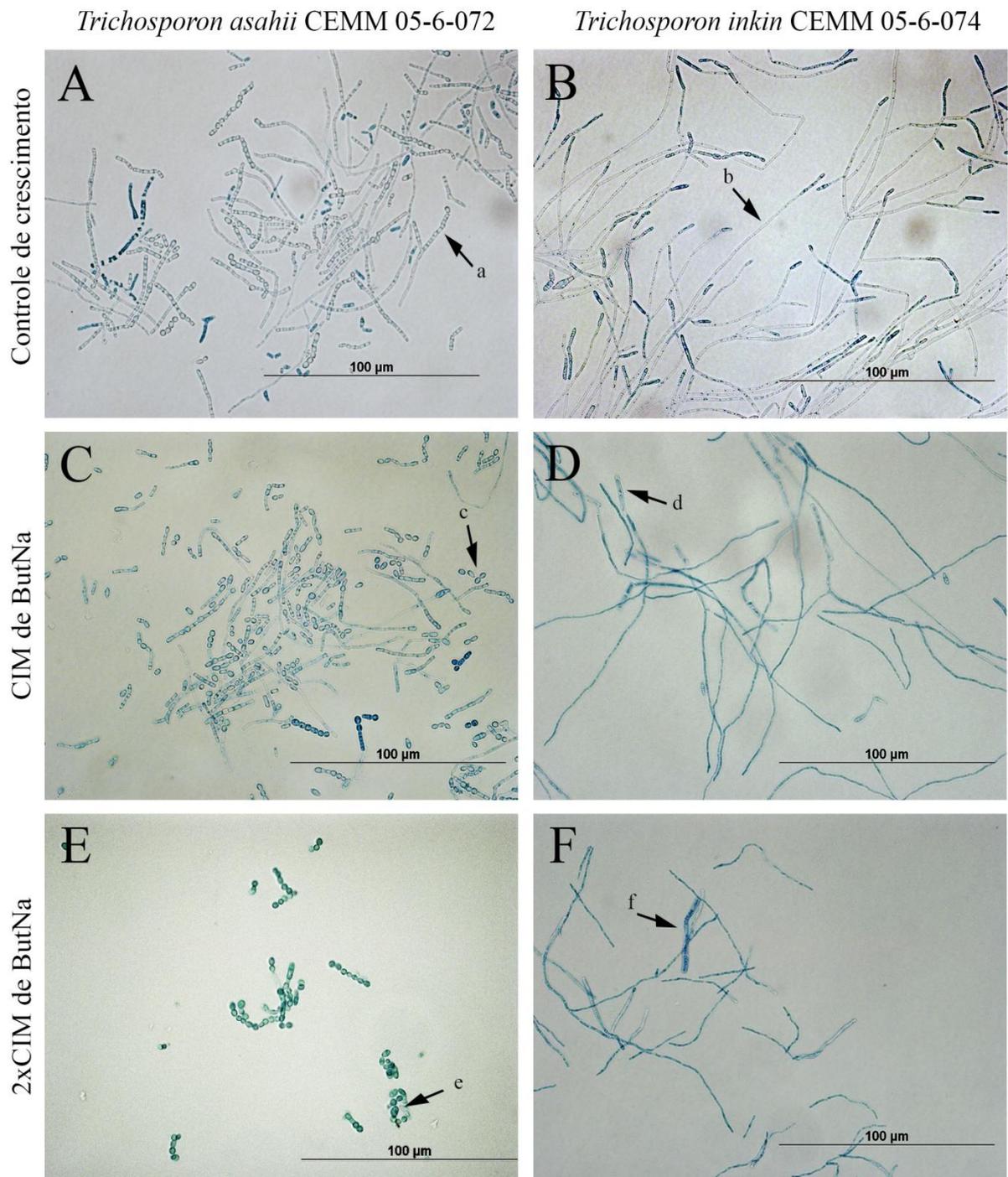


Figura 14. Efeito do ButNa sobre a morfologia de *T. asahii* e *T. inkin* em microcultivo. (A e B) *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074), respectivamente, controle de crescimento sem adição do ButNa. (C e D) Células de *T. asahii* e *T. inkin* após exposição à CIM do ButNa. (E e F) Células de *T. asahii* e *T. inkin* após exposição à 2 × CIM do ButNa. Na seta (a) hifa artroconidiada ramificada; (b) hifas hialinas. Em (c) e (e) blastoconídios; (d e f) hifas hialinas vacuolizadas. Imagens inspecionadas sob um microscópio óptico usando objetiva de 40x. Estruturas coradas com solução azul de algodão lactofenol. Fonte: a autora – CEMM/UFC (2018).

6.6 Efeito do ButNa sobre a morfologia e a estrutura de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

A morfologia e estrutura de biofilmes de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074) foi avaliada através da exposição do biofilme maduro dessas cepas ao ButNa na concentração CIM e 10xCIM planctônico. A análise foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (Figura 15) e microscopia confocal de varredura a laser (Figura 16 e 17). Na microscopia eletrônica de varredura, observou-se que o biofilme de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) exposto ao ButNa (CIM e 10xCIM) apresentou forma desestruturada, com presença de hifas finas e quebradiças (Figura 15C) e artroconídeos (Figura 15E). De forma semelhante, o biofilme de *T. inkin* (CEMM 05-6-074) exposto ao ButNa (CIM e 10xCIM) apresentou-se desestruturado, com presença de hifas quebradiças (Figura 15D) e colabadas (Figura 15F), evidenciando o dano celular.

Na análise por microscopia confocal de varredura a laser, pôde-se verificar que o biofilme de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) exposto ao ButNa (CIM) apresentou diversas células mortas (observadas na coloração vermelha), bem como um biofilme desestruturado (Figura 16B), contendo espaços vazios, devido à redução da biomassa. Essa mesma cepa, quando exposta ao ButNa (10xCIM), evidenciou a presença de abundantes células mortas (Figura 16C) e significativa ($p < 0,05$) redução da biomassa (Figura 17A). Biofilme de *T. inkin* (CEMM 05-6-074) exposto ao ButNa (CIM) também se apresentou desestruturado, com presença de hifas quebradiças (Figura 16E) e significativa ($p < 0,05$) redução da biomassa (Figura 17A). Tal efeito se potencializou quando biofilme maduro dessa mesma cepa foi exposta ao ButNa (10xCIM), revelando abundantes células mortas (Figura 16F) e significativa ($p < 0,05$) redução da biomassa (Figura 17A). Houve aumento significativo ($p < 0,05$) da espessura (Figura 17B) e do biovolume relativo (Figura 17C) dos biofilmes maduros da cepa de *T. asahii* exposta ao ButNa (CIM) sem ocorrência de aumento da matriz extracelular, sugerindo ser uma resposta do fungo ao estresse celular sofrido pela exposição à droga. Os gráficos mostrados na Figura 17D representaram a intensidade colorimétrica das células vivas (coradas com SYTO9) e mortas / danificadas (coradas com iodeto de propídio), adquiridas através de microscopia confocal de varredura a laser, e evidenciam uma redução significativa ($p < 0,05$) de células vivas e aumento significativo ($p < 0,05$) de células mortas de ambas as cepas expostas ao ButNa (10xCIM), enfatizando a ação antibiofilme apresentada pelo butirato de sódio.

6.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

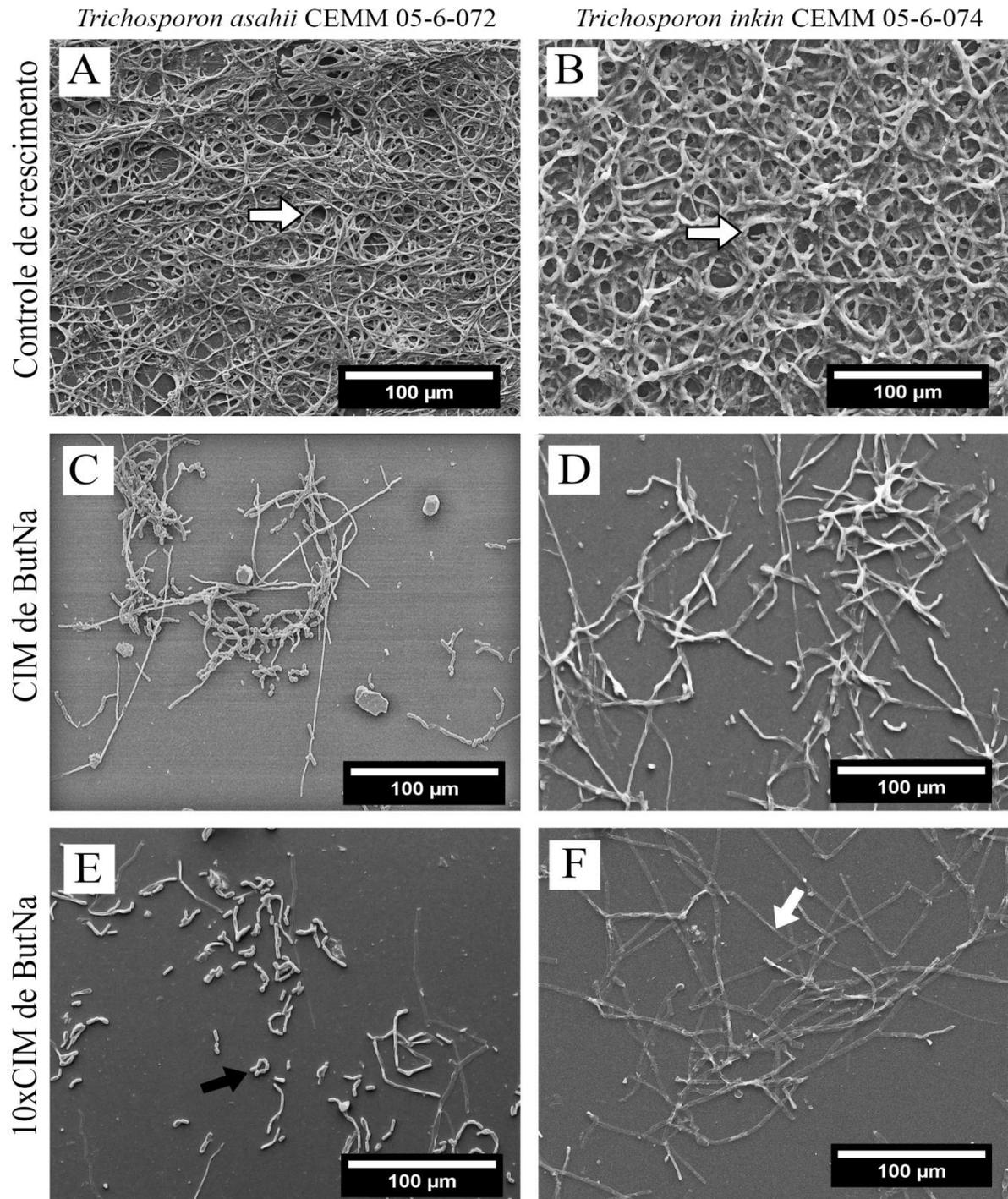


Figura 15. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilme maduro de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074). (A e B) Controle de crescimento do biofilme maduro de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, sem exposição ao ButNa. (C e D) Biofilme maduro de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, após exposição à CIM planctônica do ButNa, evidenciando comprometimento de sua estrutura. (E e F) Biofilme maduro desestruturado de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, após exposição à 10xCIM planctônica do ButNa. Setas brancas com borda preta indicam canais de passagem de água. Seta preta indica artroconídeos. Seta branca indica hifa colabada e com estrutura comprometida. Magnitude: 1000x. Fonte: a autora – CEMM/UFC (2018).

6.6.2 Microscopia confocal de varredura a laser

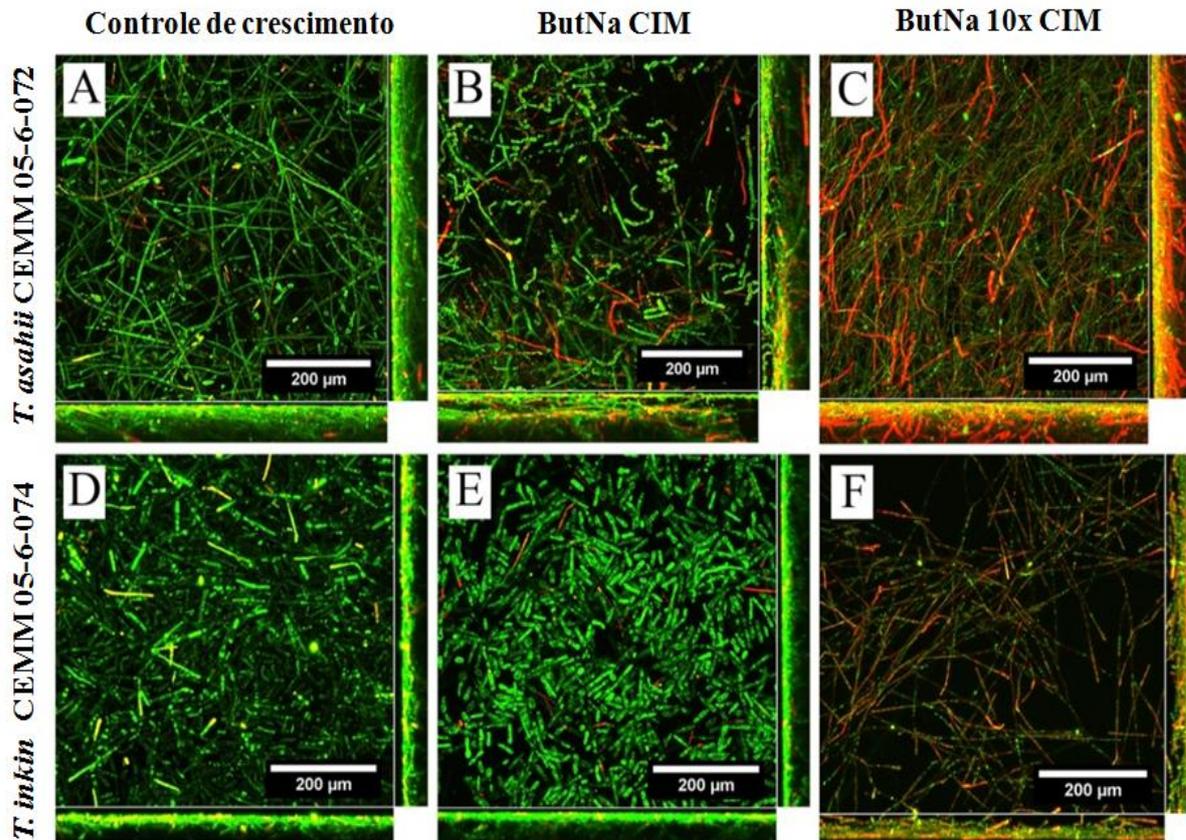


Figura 16. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074). (A e D, respectivamente) Controle de crescimento de biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, sem adição de ButNa. (B and E) Biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, após exposição à CIM planctônica do ButNa. (C e F) Biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, após exposição à 10x a CIM planctônica do ButNa.

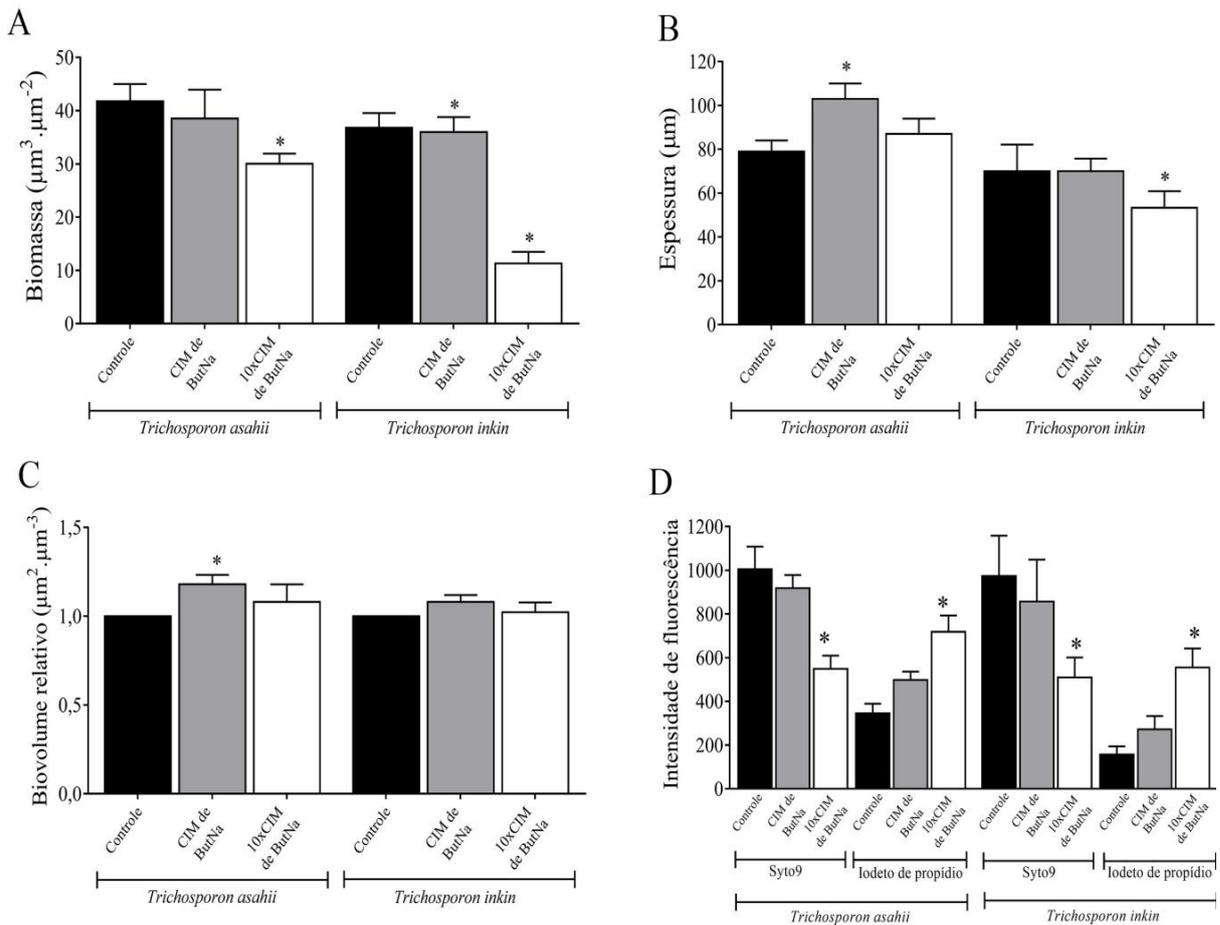


Figura 17. Os gráficos representam a intensidade colorimétrica das células vivas e mortas / danificadas coradas com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente, adquiridas através de microscopia confocal de varredura a laser. (A) Biomassa, (B) Espessura, (C) Biovolume e (D) Intensidade de fluorescência de biofilmes maduros de *Trichosporon* (48 h) em meio RPMI (barras pretas), RPMI adicionada CIM planctônica do ButNa (barras cinzas) e RPMI adicionado de 10xCIM planctônica do ButNa (barras brancas). * Diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle de crescimento livre de drogas ($p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm relacionado o remodelamento da cromatina à regulação da expressão gênica, induzindo alterações fenotípicas epigenéticas em fungos como *Candida albicans* (TSCHERNER *et al.*, 2015), *Cryptococcus. Neoformans* (BRANDÃO *et al.*, 2015), *Aspergillus fumigatus* (PALMER *et al.*, 2013), *Saccharomyces cerevisiae* (KOCH *et al.*, 2018) , *Schizosaccharomyces pombe* (ALLSHIRE e EKWALL, 2015) e *Ustilago maydis* (ELIAS-VILLALOBOS *et al.*, 2015).

Pesquisas mostram que inibidores de histona desacetilase (iHDAC), como o butirato de sódio, suprimem a produção de fenótipos de virulência e a resistência a antifúngicos em patógenos humanos oportunistas (NGUYEN *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2015). Há, também, relatos que o ButNa diminui o crescimento de leveduras e afeta a morfogênese, a formação de biofilme e a resistência antifúngica de *C. albicans*, *C. parapsilosis* (NGUYEN *et al.*, 2011) e *C. neoformans* (BRANDÃO *et al.*, 2015).

Os resultados do presente estudo mostraram que o ButNa foi capaz de reduzir em 50% o crescimento *in vitro* de células planctônicas de *Trichosporon spp.* com relação ao controle de crescimento livre de drogas em concentrações fixas de 60 e 120 mM. Quando comparado com *Cryptococcus spp.*, aparentemente *Trichosporon spp.* se apresentam como leveduras basidiomicetos mais tolerantes ao ButNa, tendo em vista os resultados de Nguyen e colegas (2011), os quais descobriram que concentrações de 20 a 60 mM de ButNa resultaram em uma redução de 60% a 82% no crescimento de *C. neoformans*.

Em concordância, Brandão *et al.* (2015) mostraram que 1 mM de ButNa foi capaz de inibir o crescimento de *C. neoformans*, sendo suas cepas estudadas mais sensíveis à droga testada. Por outro lado, a sensibilidade de *Trichosporon* ao ButNa foi similar às cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, que foram inibidas em 33% - 57% após o tratamento com 20-60 mM de NaBut (NGUYEN *et al.*, 2011).

No teste de interação farmacológica com outros antifúngicos, apesar da variação na resposta das combinações das drogas para cada espécie testada, observou-se maior ocorrência de sinergismo na combinação do ButNa com o FLC, em concordância com os achados no trabalho feito por Nguyen e colaboradores (2011), que fizeram a combinação do ButNa (20 mM e 40 mM) com AMB (0,5 µg/mL), FLC (2 µg/mL) e CAS (8 µg/mL) frente a cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans* e verificaram a ocorrência de sinergismo apenas entre o ButNa (40 mM) em combinação com o FLC (2 µg/mL) frente a todas as cepas testadas, não apresentando sinergismos para as outras combinações dos antifúngicos.

No teste de sensibilidade de biofilmes de *Trichosporon* spp. ao ButNa, células sésseis foram expostas ao ButNa nas concentrações CIM e 10xCIM planctônico e analisadas quantitativamente nas fases de adesão, desenvolvimento e maturação. Os resultados mostraram que o ButNa interferiu no processo de adesão célula-substrato nos biofilmes de *Trichosporon*, uma vez que houve redução significativa da atividade metabólica das células tratadas com a droga com relação ao controle de crescimento sem ButNa. Nesta fase, a biomassa não foi analisada, porque seu valor é insignificante, enquanto as células estão começando a aderir à placa.

Tais resultados são bastante relevantes, visto que a capacidade que espécies de *Trichosporon* possuem de se aderir em cateteres (por exemplo: cateter venoso central e cateter peritoneal), predispõe os pacientes usuários desses dispositivos a contraírem tricosporonose invasiva, com sepse e acometimento de diversos órgãos, o que agrava o quadro clínico dos pacientes, os quais geralmente são imunocomprometidos (ITURRIETA-GONZÁLEZ *et al.* 2014; MONTOYA *et al.*, 2018). Dessa forma, diminuindo a adesão dessas células aos dispositivos médicos, o ButNa pode representar uma forma de controle de infecções fúngicas invasivas causadas por esse fungo.

Biofilmes maduros já estabelecidos em superfície de poliestireno também foram significativamente prejudicados pelo ButNa na concentração de 120 mM. Um estudo anterior mostrou que 10 mM de ButNa foi capaz de inibir a formação de biofilme em 65% em *C. neoformans* e *C. parapsilosis* (NGUYEN *et al.*, 2011). No entanto, a atividade anti-biofilme de ButNa contra biofilmes de *Trichosporon* merece relevante atenção, uma vez que essas comunidades são menos sensíveis aos antifúngicos sendo até 8.000 vezes mais tolerantes do que as células planctônicas (Di BONAVENTURA *et al.*, 2006; MONTOYA *et al.*, 2018).

Di Bonaventura e colaboradores (2006) testaram a ação de antifúngicos clássicos sobre a sensibilidade de células planctônicas e sésseis de *Trichosporon* spp. e observaram que nos biofilmes a CIM do voriconazol foi 8.533 vezes maior do que a CIM desta droga frente às células planctônicas. Para fluconazol, o aumento observado da CIM em biofilme foi de 256 vezes. Com anfotericina B, houve aumento de 128 vezes e, para caspofungina, houve elevação em 32 vezes com relação ao valor da CIM planctônica. Outros estudos mostraram que os biofilmes foram mais tolerantes, também, aos mecanismos de defesa imunológicos e aos estresses físicos e químicos (LIAO *et al.*, 2014; CORDEIRO *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016).

No teste de interação farmacológica do ButNa com os antifúngicos AMB, FLC, VRC e CAS frente a biofilmes de *Trichosporon* spp. nas fases de adesão, desenvolvimento e

biofilme maduro, verificou-se resultados bem diversificados. Na fase de adesão, houve melhoramento no desempenho do antifúngico das combinações: ButNa/AMB, ButNa/VRC e ButNa/CAS, mas não para ButNa/FLC para ambas as cepas testadas. Já no biofilme em desenvolvimento, o melhor efeito visto foi na combinação ButNa/VRC, tanto na redução da atividade metabólica (para *T. asahii* e *T. inkin*), quanto na redução da biomassa (apenas de *T. asahii*), o que é um achado importante, já que o voriconazol é, muitas vezes, a droga de escolha para tratar tricosporonose invasiva.

Por fim, em biofilme maduro, para todas as combinações das drogas, não houve redução significativa da atividade metabólica das cepas testadas. Entretanto, houve redução da biomassa de todas as cepas testadas com as combinações ButNa/AMB, ButNa/FLC e ButNa/CAS. Esses resultados mostraram que o butirato de sódio interagiu de formas diversas com os antifúngicos testados, mas que, no geral, atuou melhorando a ação das drogas e afetando os biofilmes testados, em suas diferentes etapas, apesar de não se ter visto um padrão nas respostas apresentadas.

A ação do butirato de sódio em biofilmes é relevante, visto que o estabelecimento de células associadas em biofilmes é um importante fator de virulência, pois essas células apresentam maior produção de enzimas proteolíticas, o que aumenta a capacidade de invasão tecidual e disseminação do fungo no interior do paciente (ITURRIETA-GONZÁLEZ *et al.*, 2014; GABRIELLI *et al.*, 2016). Além disso, os mecanismos de resistência dos biofilmes de *Trichosporon* não são conhecidos, mas acredita-se que a elevada tolerância aos antifúngicos ocorre em virtude do aumento da densidade celular, efeito protetor da matriz exopolimérica, presença de células persistentes e resistência mediada por bomba de efluxo (RAMAGE *et al.*, 2012; FLEMMING *et al.*, 2016).

O ButNa é um sal de sódio do butirato, um ácido graxo endógeno saturado de cadeia curta, que possui solubilidade na água e propriedades anfifílicas (COOK & SELLIN, 1998; GILL *et al.*, 2018). Portanto, sugere-se que essas características físico-químicas permitam uma boa penetração desse fármaco no biofilme, gerando uma interação anfifílica entre o substrato e o biofilme, uma vez que a matriz consiste em aproximadamente 97% de água (FLEMMING *et al.*, 2016). Já sua interação variável de acordo com o antifúngico testado pode ser relacionada à interação interestrutural das diferentes drogas bem como o mecanismo de ação apresentado por cada uma delas.

Sabe-se que *Trichosporon* spp. são fungos pleomórficos, nos quais a filamentação é um importante fator de virulência, por ser um dos desencadeadores de invasão tecidual e disseminação fúngica (COLOMBO, PADOVAN & CHAVES, 2011). Para avaliar a

capacidade do ButNa de alterar a filimentação e outras estruturas micromorfológicas de *Trichosporon* spp., fez-se o ensaio de filimentação em microcultivo. A análise dos resultados mostrou que o ButNa afetou a filimentação da cepa *T. asahii* exposta ao ButNa (120 mM) e ButNa (240 mM), revelando hifas quebradas e um aumento do número de blastoconídios e artroconídios, quando comparados com o controle do crescimento sem drogas.

Em concordância, a cepa de *T. inkin*, quando exposta ao ButNa (120 mM) e ButNa (240 mM), também apresentou alterações morfológicas, com presença de hifas mais finas e vacuoladas, sugerindo processo de degradação celular. De forma semelhante, Nguyen *et al.* (2011) mostraram que ButNa na concentração 20 mM suprimiu significativamente a filimentação de *C. albicans*. Adicionalmente, estudos mostram que o ButNa pode afetar a diferenciação celular, motilidade, proliferação, indução de parada do ciclo celular e apoptose, promovendo dano celular (BRANDÃO *et al.*, 2015; BRANDÃO *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2003; NAKAGAWA *et al.*, 2018).

De acordo com a análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura, observou-se que o ButNa, na concentração de 120 mM, foi capaz de desestruturar o biofilme, quebrando as hifas e reduzindo significativamente a quantidade de matriz extracelular polimérica. Este efeito foi potencializado na concentração de 1200 mM, onde foram observadas hifas frágeis e colabadas. Além disso, verificou-se que os biofilmes tratados com ButNa apresentaram menos estruturas filamentosas que os controles, o que é importante, uma vez que a filimentação é um importante fator de virulência.

De forma semelhante, a análise por microscopia confocal de varredura a laser de biofilmes maduros expostos ao ButNa (120 mM) revelou biofilmes desestruturados, apresentando hifas quebradiças e biomassa reduzida. Já com ButNa na concentração de 1200 mM, os biofilmes maduros revelaram presença de abundantes células mortas e significativa redução de biomassa, evidenciando dano celular, em concordância com os resultados vistos em outros testes aplicados no presente trabalho.

Apesar de o butirato de sódio ainda não ter seu mecanismo de ação, como o iHDAC, completamente elucidado, sugere-se que o grupo químico carboxílico atue como ligante de zinco ou concorra com o acetato liberado pela reação de desacetilação (MAI e ALTUCCI, 2009). Pesquisadores estudaram a ação do ButNa em macrófagos infectados com leveduras e observaram que esse fármaco aumentou a produção de óxido nítrico por macrófagos, levando à morte de leveduras, e os macrófagos permaneceram viáveis (NGUYEN *et al.*, 2011).

Dessa forma, os resultados observados no presente trabalho revelaram o butirato de sódio como uma substância promissora na busca por estratégias de combate a infecções fúngicas invasivas causadas por espécies patogênicas de *Trichosporon*.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o ButNa é um inibidor do crescimento planctônico de *T. asahii* e *T. inkin*, *in vitro*. Além disso, foi demonstrado que o ButNa atua em conjunto com drogas antifúngicas, melhorando sua ação sobre células planctônicas e sésseis. Adicionalmente, verificou-se que o ButNa afeta a adesão, o desenvolvimento e a maturação dos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, reduzindo significativamente a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes analisados e alterando sua ultraestrutura e morfologia celular. Apesar de o ButNa ter apresentado potencial ação antifúngica, *in vitro*, não foram realizados experimentos *in vivo* no presente trabalho. Portanto, novos estudos devem avaliar se o ButNa pode representar uma alternativa para a prevenção e controle de infecções causadas por esse fungo emergente oportunista.

REFERÊNCIAS

- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MELHEM, M.S.; BONFIETTI, L.X.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, suplemento 19, p. 57-64, 2015.
- ALLSHIRE, R.C.; EKWALL, K. Epigenetic Regulation of Chromatin States in *Schizosaccharomyces pombe*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 7, p. a018770, 2015
- ALMEIDA, A.A.; CRISPIM, B. A.; GRISOLIA, A.B.; SVIDZINSKI, T.I.; ORTOLANI, L.G.; OLIVEIRA, K.M. Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 48, n.1, p. 62-66, 2016.
- ARCHER-DUBON, C., OROZCO-TOPETE, R.; LEYVA-SANTIAGO, J.; ARENAS, F.; CARBAJOSA, J.; YSUNZA, A. Superficial mycotic infections of the foot in a native pediatric population: a pathogenic role for *Trichosporon cutaneum*? **Pediatric Dermatology**, v. 20, p. 299–302, 2003.
- ARENDRUP, M.C.; BOEKHOUT, T.; AKOVA, M.; MEIS, J.F.; CORNELLY, O.A.; LORTHOLARY, O. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, supl. 3, p.76–98. 2014.
- ARENDRUP, M.C.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J.W.; GUINEA, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; LAGROU, K.; HOWARD, S.J. EUCAST, S. ON A. S. T. (AFST) OF THE E. E. C. FOR A. S. T. EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents. **Clinical Microbiology and Infection**, v.22, n.6, p. 571-e1, 2016.
- BEHREND, G. Ueber *Trichomyces nodosa* (Juhel-Rénoy): *Piedra* (Osorio). **Berliner Klinische Wochenschrift**, v. 27, p. 464-467, 1890.
- BEURMANN, L.; GOUGEROT, H. AND VAUCHER, H. *Oidiomycose gommeuse*, ulcéreuse, disséminée. Mycose nouvelle, due à un parasite nouveau: l'*Oidium cutaneum* (ancien groupé des Blastomycoses). **Revue de Médecine**, v. 30, p. 937-958, 1940.
- BRANDÃO, F.A.S.; DERENGOWSKI, L.S.; ALBUQUERQUE, P., NICOLA, A.M.; SILVA-PEREIRA, I.; POÇAS-FONSECA, M.J. Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. **Virulence**, v. 6, n.6, p.61-630. July, 2015.
- BRANDÃO, F.; ESHER, S.K.; OST, K.S.; PIANALTO, K.; NICHOLS, C.B.; FERNANDES, L.; BOCCA, A.L.; POÇAS-FONSECA, M.J.; ALSPAUGH, A. HDAC genes play distinct and redundant roles in *Cryptococcus neoformans* virulence. **Scientific reports**, v. 8, n. 5209, 2018.

BROSCH, G.; LOIDL, P. GRAESSLE, S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n.3, p. 409-439. 2008.

BROWN, G.D.; DENNING, D.W.; GOW, N.A.; LEVITZ, S.M.; NETEA, M.G.; WHITE, T.C. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, p.165rv13, 2012.

BUCHAN, B.W.; LEDEBOER, N.A. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 783-822, 2014.

BUONVICINO, D.; FELICI, R.; RANIERI, G.; CARAMELLI, R.; LAPUCCI, A.; CAVONE, L.; MUZZI, M.; DI PIETRO, L.; BERNARDINI, C.; ZWERGEL, C.; VALENTE, S.; MAI, A.; CHIARUGI, A. Effects of Class II-Selective Histone Deacetylase Inhibitor on Neuromuscular Function and Disease Progression in SOD1-ALS Mice. **Neuroscience**, v. 379, p. 228-238, 2018.

CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. Antifungals, **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2016.

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

CHANG, Y., YU, S., HEITMAN, J., WELLINGTON, M. AND CHEN, Y. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v.8, p. 222-236, 2017.

CHEN, J.S.; FALLER, D.V.; SPANJAARD, R.A. Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? **Current Cancer Drug Targets**, v. 3, p. 219–36, 2003.

CHO, O.; MATSUKURA, M.; SUGITA, T. Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. **International Journal of Infection Diseases**, v. 38, p. 87- 88, 2015.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard-second edition. M38A2ed. WAYNE, PA. Standard by Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition. M27A3ed. WAYNE, PA. Standard by Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth informational supplement. M27S4ed. WAYNE, PA. Standard by Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COLLEPARDO- GUEVARA, R.; PORTELLA, G.; VENDRUSCOLO, M.; FRENKEL, D.; SCHLICK, T.; OROZCO, M. Chromatin Unfolding by Epigenetic Modifications Explained by Dramatic Impairment of Internucleosome Interactions: A Multiscale Computational Study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n.32, p. 10205–10215, 2015.

COLLINS, T.J. **ImageJ for microscopy. Biotech**, v. 43, p. 25–30, 2007; doi:10.2144/000112517.

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.

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.G. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v.64, p. 1277-1286. Nov, 2015.

CORDEIRO, R.A.; EVANGELISTA, A.J.J.; SERPA, R.; MARQUES, F.J.F.; DE MELO, C.V.S.; DE OLIVEIRA, J.S.; FRANCO, J.S.; DE ALENCAR, L.P.; BANDEIRA, T.J.P.G.; BRILHANTE, R.S.N.; SIDRIM, J.J.G.; 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**, 162, 309–317, 2016.

COOK, S.I.; SELLIN, J.H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Alimentary Pharmacology and Therapy**, v. 12, p. 499-507, 1998.

COSTA, E.B.O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.34, n.2, p. 125-136. Londrina, 2013.

DABAS, Y; XESS, I; KALE, P. Molecular and antifungal susceptibility study on trichosporonemia and emergence of *Trichosporon mycotoxinivorans* as a bloodstream pathogen. **Medical Mycology**, v. 55, n. 5, p. 518-527, 2017.

DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; FIGUEIREDO, D.S.Y.; TOUBAS, D.; DEL NEGRO, G.M.B.; MOTTA, A.L.; ROSSI, F.; GUITARD, J.; MORIO, F.; BAILLY, E; ANGOULVANT, A.; MAZIER, D.; BENARD, G.; ENNEQUIN, C. Usefulness of matrix-assisted laser desorption ionisation- time-of-flight mass spectrometry for identifying clinical *Trichosporon* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v.20, p. 784-790, 2014.

DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* Infection: A systematic review on a re-emerging fungal pathogen. **Infectious Diseases**, v. 7, p. 1629, 2016.

DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N; FAVERO GIMENES, V.M.; FRANCISCO, E.C.; MACHADO SIQUEIRA, L.P.; GONÇALVES DE ALMEIDA, R.K.; GUITARD, J.; HENNEQUIN, C.; COLOMBO, A.L.; BENARD, G.; ROSSI, F. Evaluating and Improving Vitek MS for Identification of Clinically Relevant Species of *Trichosporon* and the Closely Related Genera *Cutaneotrichosporon* and *Apiotrichum*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 55, n.8, p. 2439-2444, 2017.

DE CARVALHO, M.H.G.F.; DOS SANTOS, F.B.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; ALMEIDA-PAES, R. L-dihydroxyphenylalanine induces melanin

production by members of the genus *Trichosporon*. **FEMS yeast research**; v.14; n.6; p. 988-991. 2014.

DECHO, A.W. Unique and baffling aspects of the matrix: EPS syneresis and glass formation during desiccation. In: Flemming H. C, Wingender J, Neu TR (eds). **The Perfect Slime Microbial Extracellular Polymeric Substances**. IWA Publishing; London, UK, p. 207-226, 2016.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERRAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2th ed., Guanabara, Rio de Janeiro, 2000.

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.

DIOMEDI, P.A. Nuevos antifúngicos: Lasequinocandinas. **Revista chilena de infectología**, v. 21, n. 2, p. 89-101, 2004.

ELIAS-VILLALOBOS, A.; FERNANDEZ-ALVAREZ, A.; MORENO-SANCHEZ, I.; HELMLINGER, D.; IBEAS, J.I. The Hos2 Histone Deacetylase Controls *Ustilago maydis* Virulence through Direct Regulation of Mating-Type Genes. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 8, p. e1005134, 2015.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S.A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 563- 575, 2016.

FONSECA, F.L.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; FISCHMAN-GOMPERTZ, O.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L. Structural and functional properties of the *Trichosporon asahii* glucuronoxylomannan. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 46, p. 496-505. 2009.

FUENTEFRIA, A.M.; PIPPI, B.; DALLA LANA, D.F.; DONATO, K.K.; DE ANDRADE, S.F. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Applied Microbiology**, v.66, n.1, p. 2-13, 2017.

FUSARO, R.M.; MILLER, N.G. Onychomycosis caused by *Trichosporon beigelii* in the United States. **Journal of the American Academy Dermatology**, v. 11, p. 747-749, 1984.

GABRIELLI, E.; SABBATINI, S.; ROSELLETTI, E.; KASPER, L.; PERITO, S.; HUBE, B.; CASSONE, A.; VECCHIARELLI, A.; PERICOLINI, E. In vivo induction of neutrophil chemotaxis by secretory aspartyl proteinases of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 7, n. 7, p. 819-825, 2016.

GIBNEY, E.R.; NOLAN, C.M.; Epigenetics and gene expression. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 4-13, 2010.

GONUL, S.; GEDIK, S.; OZTURK, B.T.; BAKBAK, B.; KOKTEKIR, B.E.; OKUDAN, S.; DAGI, H.T. Postoperative fungal endophthalmitis caused by *Trichosporon asahii* treated with voriconazole. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 78, n. 4, p. 252-254, 2015.

GUÉHO, E.; DE HOOG, G.S. AND SMITH, M.T.H. Neotypification of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 61, p. 285-289, 1992.

GUÉHO, E.; SMITH, M.T.H.; DE HOOG, G.S.; BILLON-GRAND, G.; CHRISTEN, R. AND BATENBURG-VAN DER VETGE, W.B. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 61, p. 289-316, 1992.

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

GILL, P.A.; VAN ZELM, M.Z.; MUIR, J.G.; GILBSON, P.R. Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. **Alimentary Pharmacology Therapy**, p. 1–20, 2018.

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

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

HAMILTON, J.P. Epigenetics: principles and practice. **Digestive Diseases**, v.29, n.2, p. 130-135. 2011.

HNISZ, D.; MAJER, O.; FROHNER, I.E.; KOMNENOVIC, V.; KUCHLER, K. The Set3/Hos2 histone deacetylase complex attenuates cAMP/PKA signaling to regulate morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Plos Pathogens**, v. 6, p. e1000889, 2010.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S. HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149-169, 2016.

HOLLENDER, C.; LIU, ZHONGCHI. Histone Deacetylase Genes in *Arabidopsis* Development. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 7, p. 875-885, 2008.

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

IRENE, C.; THEIS, J.F.; GRESHAM, D.; SOTEROPOULOS, P.; NEWLON, C.S. Hst3p, a histone deacetylase, promotes maintenance of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III lacking efficient replication origins. **Molecular Genetics and Genomics**, v.291, p. 271–283, 2016.

ITURRIETA-GONZÁLEZ, I.A.; PADOVAN, A.C.B.; BIZERRA, F.C.; HAHN, R.C.; COLOMBO, A.N. Multiple Species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. **Plos one**, v.9, p. 10, 2014.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n.1, p. 120-128, 2008.

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 & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Elsevier: Amsterdam, 3^a ed., 1984.

KOBAYASHI, H.; KIKYO, N. Epigenetic regulation of open chromatin in pluripotent stem cells. **Translational Research**, v.165, n. 1, p. 18-27, 2015.

KOCH, M.R.; HOUSE, N.C.M.; COSETTA, C.M.; JONG, R.M.; SALOMON, C.G.; JOYCE, C.E. *et al.* The Chromatin Remodeler Isw1 Prevents CAG Repeat Expansions During Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 208, n. 3, p. 963–976, 2018.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts, a taxonomic study**. Elsevier: Amsterdam, 5^a ed., 2011.

LEDER, A.; ORKIN, S.; LEDER, P. Differentiation of erythroleukemic cells in the presence of inhibitors of DNA synthesis. **Science**, v. 190, p. 893-894, 1975.

LEONEL, A.J. AND ALVAREZ-LEITE, J.I. Butyrate: implications for intestinal function. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v.15, p. 474-479, 2012.

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

LIAO, Y.; LU, X.; YANG, S.; LUO, Y.; CHEN, Q.; YANG, R. Epidemiology and outcome of *Trichosporon* fungemia: a Review of 15 reported cases from 195 to 2014. **Forum Infectious Diseases**, v.2, n.4, p.141. 2015.

LOHSE, M.B.; JOHNSON, A.D. Temporal anatomy of an epigenetic switch in cell programming: the white-opaque transition of *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v.72, n.2., p. 331-343. 2010.

LUGER, K., DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.13, p. 436–447, 2012.

LIU, X.Z.; WANG, Q.M.; GÖKER, M.; GROENEWALD, M.; KACHALKIN, A.V.; LUMBSCH, H.T.; MILLANES, A.M.; WEDIN, M.; YURKOV, A.M.; BOEKHOUT, T.; BAI, F.Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, v. 81, p.85–147, 2015.

MADA, P.K.; AYOADE, F.; LI, A.; TODD, J., *Trichosporon asahii* septic thrombophlebitis following lower extremity amputation in an immunocompetent host. **BMJ case reports**, 2018. Doi:10.1136/bcr-2017-221441. Acessado no dia 01 de abril de 2018 em: <http://casereports.bmj.com/content/2018/bcr-2017-221441>

MAGALHÃES, A.R.; NISHIKAWA, M.M.; DE MONDINO, S.S.B.; DE MACEDO, H.W.; DA ROCHA, E.M. DA S.; BAPTISTA, A.R. DE S. *Trichosporon* isolation from human ungueal infections: is there a pathogenic role? **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 2, p. 173-179, 2016.

MAI, A., ALTUCCI, L. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. **International Journal of Biochemical Cell Biology**, v. 41, n. 1, p. 199-213, 2009.

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. e1004982, 2015a. Acessado no dia 22 de dezembro de 2017 em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004982>

MARINÉ, M; BOM, V. L. P.; CASTRO, P. A.; WINKELSTROTER, L. K.; RAMALHO, L. N.; BROWN, N. A.; GOLDMAN, G. H. The development of animal infection models and antifungal efficacy assays against clinical isolates of *Trichosporon asahii*, *T. asteroides* and *T. inkin*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 476-486, 2015b.

MONTOYA, A.M.; SÁNCHEZ GONZÁLEZ, A.S.; PALMA-NICOLÁS, J.P.; GÓMEZ-TREVIÑO, A.; GONZÁLEZ, J.G.; GONZÁLEZ, G.M. Genotyping, extracellular compounds, and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated from Mexican patients. **Medical Mycology**, v. 00, n. 00, p. 1–7, 2015.

MESSIAS SILVESTRE A.J., ALEXANDRE BANDEIRA RAMPAZZO MIRANDA, M. & PIRES DE CAMARGO Z. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a Brazilian population. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41, 628-634, 2010.

MONTOYA, A.M.; LUNA-RODRIGUEZ, C.E.; TREVIÑO-RANGEL, R. DE J.; BECERRIL-GARCÍA, M.; BALLESTEROS-ELIZONDO, R.G.; SAUCEDO-CÁRDENAS, O.; GONZALE, G.M. In vivo pathogenicity of *Trichosporon asahii* isolates with different in vitro enzymatic profiles in an immunocompetent murine model of systemic trichosporonosis. **Medical Mycology**, v. 00, p. 1-8, 2017.

MONTOYA, A.M.; ELIZONDO-ZERTUCHE, M.; TREVIÑO-RANGEL, R.J.; BECERRIL-GARCÍA, M.; GONZÁLEZ, G.M. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n.1, p. 22-26, 2018.

MORAIS-BRAGA, M.F.B.; CARNEIRO, J.N.P.; MACHADO, A.J.T.; SALES, D.L.; DOS 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.

NAKAGAWA, H., YUI, Y., SASAGAWA, S. et al. Evidence for intrathecal sodium butyrate as a novel option for leptomeningeal metastasis. **Journal of Neurooncology**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2852-2>

NGUYEN, L.N.; LOPES, L.C.; CORDERO, R.J.; NOSANCHUK, J.D. Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, n.11, p. 2573- 2580. 2011.

NOLAN, T.; BRACCINI, *et al.* The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE 1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n.5, p. 1564-1573, 2005.

NOONEY, L., MATTHEWS, R. C. e BURNIE, J. P. Evaluation of MycograbH, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.51, p. 19–29, 2005.

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

OLIVEIRA, L.C. **Efeito de drogas moduladoras da estrutura da cromatina a interação entre macrófagos murinos e *Paracoccidioides brasiliensis***. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

O'MEARA, T.R.; HAY, C.; PRICE, M.S.; GILES, S.; ALSPAUGH, J.A. *Cryptococcus neoformans* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal adaptation to the host. **Eukaryotic Cell**, p. 1193-1202. 2010.

OTA, M. Sur quelques champignons pathogènes du type *Trichosporon beigelli* Vuillemin. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 4, p.1-13, 1926.

PALMER, J.M. *et al.* H3K9 methylation regulates growth and development in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n.12, p. 2052-2060. 2008.

PALMER, J.M.; BOK, J.W.; LEE, S.; DAGENAIS, T.R.T.; ANDES, D.R. *et al.* Loss of CclA, required for histone 3 lysine 4 methylation, decreases growth but increases secondary metabolite production in *Aspergillus fumigatus*. **PeerJ**, v. 19, n. 1, p. e4, 2013.

PEREIRA, D. N.; NADER, S. S.; NADER, P.; MARTINS, P.G.; FURLAN, S.P.; HENTGES, C.R. **Disseminated *Trichosporon* spp infection in preterm newborns: a case report**, v.85, n. 5, p. 459-61, 2009.

POLVI, E.J.; LI, X.; O'MEARA, T.R.; LEACH, M.D.; COWEN, L.E. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.72, n. 12, p. 2261–2287, 2015.

PRIVALSKY, M.L. **Transcriptional corepressors: mediators of eukaryotic gene repression**. Springer, 2001.

PURVES, ORIAN, & HELLER, **Life, the Science of Biology**, 9th ed., 2009.

RABENHORST, L. Zwei Parasiten an den toten Haaren der Chignons. **Hedwigia**, v. 4, n. 1, 1867.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 528521, 2012.

RESTREPO, A.; DE URIBE, L. Isolation of fungi belonging to the genera *Geotrichum* and *Trichosporum* from human dermal lesions. **Mycopathologia**, v. 59, p. 3-9, 1976.

REVIE, N.M.; LYER, K.R.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

REX, J.H.; PFALLER, M.A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 982-989, 2002.

ROBBINS, N.; LEACH, M.D.; COWEN, L.E. Lysine Deacetylases Hda1 and Rpd3 Regulate Hsp90 Function thereby Governing Fungal Drug Resistance. **Cell Reports**, v. 2, p. 878-888, 2012.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G.D; COWEN, L.E. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.5, p. FUNK 0002-2016, 2016.

RÖMLING, U; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v.272, n.6, p. 541-561, 2012.

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

SANDAI, D.; TABANA, Y.M.; EL OUWEINI, A.; AYODEJI, I.O. Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n.11, p. e37385, 2016.

SANDOVAL-TRESS, C; ARENAS-GUZMÁN, R.; GUZMÁN-SÁNCHEZ, D.A. Hair Shaft Yellow Nodules in a Pediatric Female Patient. **Skin Appendage Disorders**, v. 1, n. 2, p. 62-64, 2015.

SCOFIELD-KAPLAN, S.M.; CHEN, R.W.S.; FLYNN Jr., H.W.; LIN, J. HOROWITZ, J.D. Recalcitrant Endogenous Trichosporon Endophthalmitis in 2 Immunocompromised Patients. **Ophthalmology Retina**, 2018.

SELLMER, A.; Stangl, H.; Beyer, M.; Grünstein, E.; Leonhardt, M.; Pongratz, H.; Eichhorn, E.; Elz, S.; Striegl, B.; Jenei-Lanzl, Z.; Dove, S.; Straub, R.H.; Krämer, O.H.; Mahboobi, S. Marbostat-100 Defines a New Class of Potent and Selective Antiinflammatory and Antirheumatic Histone Deacetylase 6 Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.00, p. 4-80, 2018.

SIDDIQI, S.; MILLS, J. e MATUSHANSKY, I. Epigenetic Remodeling of Chromatin Architecture: Exploring Tumor Differentiation Therapies in Mesenchymal Stem Cells and Sarcomas. **Current Stem Cell Research e Therapy**, v. 5, n. 1, p. 63- 73, 2010.

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

SIMONETTI, G.; PASSARIELLO, C.; ROTILI, D.; MAI, A.; GARACI, E.; PALAMARA, A.T. Histone deacetylase inhibitors may reduce pathogenicity and virulence in *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 8, p. 1371-1380, 2007.

SMITH, W.L.; EDLIND, T.D. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p. 3532-3539, 2002.

Só Biologia. Virtuoso Tecnologia da Informação, 2008-2018. Consultado em 12/06/2018, às 00:11. Disponível na Internet em <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo2.php>.

STRAUSS, J.; REYES-DOMINGUEZ, Y. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 62-69. 2011.

SUN, W.; SU, J.; XU, S.; YAN, D. *Trichosporonasahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1750-1757, 2012.

SURAWEEERA, A; O'BYRNE, K.J.; RICHARD, D.J. Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. **Frontiers in Oncology**, v.8, n.92, 2018.

SUZUKI, K.; NAKASE, K.; KYO, T.; KOHARA, T.; SUGAWARA, Y.; SHIBAZAKI, T.; OKA, K.; TSUKADA, T.; KATAYAMA, N. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. **European Journal of Haematology**, v. 84, n. 5, p. 441-447, 2010.

TAJ-ALDEEN, S.J.; AL-ANSARI, N.; EL SHAFEI, S.; MEIS, J.F., CURFS-BREUKER, I.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Molecular identification and susceptibility of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Qatar: isolation of *Trichosporon dohaense* Taj-Aldeen, Meis & Boekhout sp. nov. **Journal Clinical Microbiology**, v. 47, n.6, p. 1791- 1799, 2009.

TAMAYO, L.J.; DOMÍNGUEZ-GIL, G.; GONZÁLEZ, M.; MARTÍN-LUENGO, A.I.; EIROS BOUZA, J.M.; PIQUERAS PÉREZ, J.M. Nosocomial infection due to *Trichosporon*

asahii in a critical burned patient. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 4, p. 257-260, 2015.

TAVERNA, C. G.; CORDOBA, S.; MURISENGO, O.A; VIVOT, W.; DAVEL, G.; BOSCOBORGEAT, 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.

TOPPER, M.J.; VAZ, M.; CHIAPPINELLI, K.B.; DESTEFANO SHIELDS, C. E.; NIKNAFS, N.; YEN, R.-W.C.; WENZEL, A.; HICKS, J.; BALLEW, M.; STONE, M.; TRAN, P.T.; ZAHNOW, C.A.; HELLMANN, M.D.; ANAGNOSOU V.; STRISSEL, P.L.; STRICK, R.; VELCULESCU, V.E.; BAYLIN, S. B. Epigenetic Therapy Ties MYC Depletion to Reversing Immune Evasion and Treating Lung Cancer. **Cell**, v.171, n.6, p. 1284-1300.e21, 2017.

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.

TSCHERNER M, ZWOLANEK F, JENULL S, SEDLAZECK FJ, PETRYSHYN A, *et al.* The *Candida albicans* Histone Acetyltransferase Hat1 Regulates Stress Resistance and Virulence via Distinct Chromatin Assembly Pathways. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005218, 2015.

VENKATESH, S. & WORKMAN, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 178–189, 2015.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K-H; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, p. 377–410, 2012.

VOSS, T.C.; HAGER, G.L. Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. **Nature Reviews Genetics**, v.15, p. 69-81, 2014.

WANG, H.; FAN, Y-Y; KUDINHA, T.; XU, Z-P; XIAO, M.; ZHANG, L.; FAN, X; KONG, F.; XU, Y-C. A Comprehensive Evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Yeasts, Part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study, 2012 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n.5, p. 1376–1380, 2016.

XIE, J.L.; POLVI, E.J.; SHEKHAR-GUTURJA, T.; COWEN, L.E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**, v. 9, n.4, p. 523-542, 2014.

ZACCHI, L.F.; SCHULZ, W.L.; DAVIS, D.A. HOS2 and HDA1 encode histone deacetylases with opposing roles *Candida albicans* morphogenesis. **Plos One**, v.5, p. e12171, 2010.

ZHANG, L.; MA, N.; LIU, Q.; MA, Y. Genome- wide screening for genes associated with valproic acid sensitivity in fission yeast. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 68738. 2013.

ZARNOWSKI, R.; WESTLER, W.M.; LACMBOUH, G.A.; MARITA, J.M.; BOTHE, J.R.; BERNNHARDT, J.; SAHROUI, A.L.H.; FONTAINE, J.; SANSSES, 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. Acessado no dia 05 de abril de 2018, disponível em: <http://mbio.asm.org/content/5/4/e01333-14.full>

ZUO, Q.; DONG, L.; MU, W.; ZHOU, L.; HU, T.; ZHANG, H. *Trichosporon asahii* infection after total knee arthroplasty: a case report and review of the literature. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 26, n.1, p. 47-51, 2015.