



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

ANA LUIZA RIBEIRO AGUIAR

**ASPECTOS FUNCIONAIS DE BIOFILMES DE *Trichosporon*: DETECÇÃO DE
CÉLULAS PERSISTENTES E ATIVIDADE DE EFLUXO EM CEPAS CLÍNICAS DE
Trichosporon asahii E *T. inkin***

FORTALEZA-CE

2022

ANA LUIZA RIBEIRO AGUIAR

**ASPECTOS FUNCIONAIS DE BIOFILMES DE *Trichosporon*: DETECÇÃO DE
CÉLULAS PERSISTENTES E ATIVIDADE DE EFLUXO EM CEPAS CLÍNICAS DE
Trichosporon asahii E *T. inkin***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

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

Área de concentração: Medicina.

Linha de pesquisa: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

FORTALEZA-CE

2022

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

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

A227a Aguiar, Ana Luiza Ribeiro.

Aspectos funcionais de biofilmes de *Trichosporon*: detecção de células persistentes e atividade de efluxo em cepas clínicas de *Trichosporon asahii* e *T. inkin* / Ana Luiza Ribeiro Aguiar. – 2022.
152 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

1. Células persistentes. 2. *Trichosporon*. 3. Sensibilidade antifúngica. 4. Biofilme. 5. Prometazina. I.
Título.

CDD 610

ANA LUIZA RIBEIRO AGUIAR

**ASPECTOS FUNCIONAIS DE BIOFILMES DE *Trichosporon*: DETECÇÃO DE
CÉLULAS PERSISTENTES E ATIVIDADE DE EFLUXO EM CEPAS CLÍNICAS DE
Trichosporon asahii E *T. inkin***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Área de concentração: Medicina.

Linha de pesquisa: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Susana Johan
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof^a. Dr^a. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Antônio José de Jesus Evangelista
Centro Universitário Unichristus (UNICHRISTUS)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

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, inspiração e fortaleza.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar nos momentos difíceis e por me dar saúde, perseverança e determinação para lutar pelos meus objetivos.

À minha mãe Nasaré, por ser minha inspiração e por todo apoio, amor e dedicação depositados em mim, incondicionalmente, durante toda a minha vida. À minha mãe Christianne, por ter me gerado e por ser minha amiga, por me ajudar nas dificuldades e por comemorar comigo todas as minhas vitórias.

Ao meu esposo Glailton Robson, por ser meu companheiro de todos os dias, por compartilhar sonhos comigo, por me aconselhar quando preciso, 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 me escutar e ser parceira nas minhas decisões acadêmicas, por todo o incentivo dado a mim e aos meus colegas (seus orientandos), por repassar seus ensinamentos e me ajudar na concretização deste projeto. Além de orientadora, é uma inspiração.

Aos demais professores os quais também colaboraram para a concretização deste trabalho, cedendo as instalações físicas, disponibilizando reagentes, ou, até mesmo, seus conhecimentos: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, Prof^a. Dra. Débora Castelo-Branco, Prof^a. Dra. Gláucia Guedes, e Prof^a. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, dentre outros, por contribuírem com seus ensinamentos para meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos professores convidados a compor a banca de defesa: Prof. Dr. Marcos Fábio, Prof^a. Dr^a. Erika Freitas, Prof. Dr. Antônio José Evangelista e Prof^a. Dr^a. Susana Johan, por contribuírem significativamente com suas sugestões para o engrandecimento desse trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial ao Bruno Nascimento, Vandbergue Santos, Anderson Cunha e Jonathas Sales por toda a ajuda disponibilizada durante as diversas etapas desse estudo, bem como pelos conselhos e palavras de incentivo, além de colegas de pós-graduação, tornaram-se grandes amigos. Aos meus colegas de trabalho e companheiros de bancada, os quais conheci durante a pós-graduação e com os quais convivi durante anos, em especial ao Fernando Monteiro, à Lívia Galdino, à Nicole Fiallos, Mariana Pergentino e à

Raquel Colares pela ajuda nos procedimentos experimentais e pelas boas conversas científicas, que foram essenciais no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos demais colegas: Expedito Maia, Gessica Araújo, Ane Teles, Silviane Praciano e Lana Glerieide pelo agradável convívio diário, pelas risadas cotidianas e pela troca de conhecimentos, que contribuíram para essa jornada ser mais leve e agradável.

Aos funcionários dessa Instituição, em especial às técnicas de laboratório, Terezinha Rodrigues e Gleiciane Rocha, e à secretária Ivone, pela disponibilidade em ajudar no que fosse preciso.

À FUNCAP pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio e 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

Trichosporon compreende um gênero fúngico cujas espécies têm sido consideradas patógenos emergentes causadores de infecções invasivas em humanos. O processo infeccioso é estabelecido principalmente em pacientes imunocomprometidos, nos quais os fungos encontram condições adequadas para expressar diversos fatores de virulência, tais como exoenzimas e biofilmes. Além disso, esses agentes apresentam grande tolerância aos antifúngicos de uso terapêutico, contribuindo para o prognóstico desfavorável em muitos pacientes. Embora os mecanismos de resistência em *Trichosporon* não sejam completamente conhecidos, evidências experimentais têm sugerido o envolvimento de bombas de efluxo na tolerância a azólicos. Sabe-se que células persistentes no interior do biofilme também contribuem para a resistência microbiana, contudo sua ocorrência ainda não foi descrita em *Trichosporon*. O objetivo da presente pesquisa foi investigar a formação de células persistentes em biofilmes de *Trichosporon asahii* e *T. inkin*, bem como o efeito, *in vitro*, da prometazina (PMZ) - um inibidor de bombas de efluxo - frente a células planctônicas e sésseis, bem como sobre a formação de células persistentes em *Trichosporon*. Avaliou-se a produção de células persistentes por meio da exposição de biofilmes maduros derivados de cepas clínicas de *T. asahii* (n=5) e *T. inkin* (n=7) à anfotericina B (AMB; 100 µg/ml) e posterior contagem de células viáveis. Células persistentes recuperadas dos biofilmes foram avaliadas quanto a sensibilidade à AMB e a capacidade de formar novos biofilmes, os quais foram estudados em seus aspectos estruturais e sensibilidade à AMB. Na segunda parte do trabalho, foi investigada a atividade da PMZ em cepas de *T. asahii* (n=5) e *T. inkin* (n=7). Para células planctônicas, realizou-se o teste de microdiluição em caldo com determinação da concentração inibitória mínima (CIM); para os biofilmes, o efeito da PMZ foi investigado quanto a atividade metabólica, biomassa, teor de carboidratos e proteínas, aspectos ultraestruturais e inibição da formação de células persistentes. Adicionalmente, foi estudada a interação da PMZ com AMB e fluconazol (FLC) em células planctônicas e biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*. A inibição da atividade de efluxo celular pela PMZ foi comprovada em ensaio empregando brometo de etídio como substrato. Células persistentes foram detectadas nos biofilmes de todas as cepas estudadas, apresentando tolerância a altas doses de AMB. Células persistentes também foram aptas a gerar novos biofilmes, entretanto estes possuíam atividade metabólica, biomassa e sensibilidade à AMB reduzida em comparação ao biofilme controle. A PMZ inibiu completamente o crescimento de células planctônicas de *T. asahii* e *T. inkin* em concentrações que variavam de 32 a 256 µg / ml. Durante as fases de adesão e desenvolvimento dos biofilmes, bem como em biofilmes maduros, houve redução significativa da atividade metabólica e da biomassa nas concentrações testadas (CIM e 10x CIM planctônico). No teste de interação entre os fármacos, observou-se que a PMZ potencializou a ação da AMB e do FLC, *in vitro*, tanto em células planctônicas quanto em biofilme. A PMZ afetou a morfologia dos biofilmes de *Trichosporon* e alterou o teor de carboidratos e proteínas dessas comunidades. Adicionalmente, biofilmes maduros pré-expostos a doses subinibitórias de PMZ produziram menos células persistentes. O presente estudo descreveu, pela primeira vez, a formação de células persistentes em biofilmes de *Trichosporon*. Ademais, foi mostrado o efeito inibitório da PMZ sobre células planctônicas e sésseis de *Trichosporon*, bem como as alterações induzidas por doses subinibitórias nos biofilmes. Os resultados indicam que a inibição do efluxo é uma estratégia promissora para o controle de *Trichosporon*.

Palavras-chave: Células persistentes. *Trichosporon*. Sensibilidade antifúngica. Biofilme. Prometazina.

ABSTRACT

Trichosporon comprises a fungal genus whose species have been considered emerging pathogens causing invasive infections in humans. The infectious process is established mainly in immunocompromised patients, in which fungi find adequate conditions to express several virulence factors, such as exoenzymes and biofilms. In addition, these agents are highly tolerant to therapeutic antifungal agents, contributing to an unfavorable prognosis in many patients. Although the mechanisms of resistance in *Trichosporon* are not fully understood, experimental evidence has suggested the involvement of efflux pumps in azole tolerance. It is known that persister cells within the biofilm also contribute to microbial resistance, however its occurrence has not yet been described in *Trichosporon*. The objective of the present research was to investigate the formation of persister cells in biofilms of *Trichosporon asahii* and *T. inkin*, as well as the *in vitro* effect of promethazine (PMZ) - an inhibitor of efflux pumps - against planktonic and sessile cells, as well as on the formation of persister cells in *Trichosporon*. The production of persister cells was evaluated by exposing mature biofilms derived from clinical strains of *T. asahii* (n=5) and *T. inkin* (n=7) to amphotericin B (AMB; 100 µg/ml) and subsequent viable cell count. Persister cells recovered from biofilms were evaluated for susceptibility to AMB and the ability to form new biofilms, which were studied for their structural aspects and susceptibility to AMB. In the second part of the work, the activity of PMZ in strains of *T. asahii* (n=5) and *T. inkin* (n=7) was investigated. For planktonic cells, the broth microdilution test was performed with determination of the minimum inhibitory concentration (MIC); for biofilms, the effect of PMZ was investigated regarding metabolic activity, biomass, carbohydrate and protein content, ultrastructural aspects and inhibition of persister cells formation. Additionally, the interaction of PMZ with AMB and fluconazole (FLC) in planktonic cells and biofilms of *T. asahii* and *T. inkin* was studied. The inhibition of cellular efflux activity by PMZ was confirmed in an assay using ethidium bromide as a substrate. Persister cells were detected in the biofilms of all strains studied, showing tolerance to high doses of AMB. Persister cells were also able to generate new biofilms, however these had reduced metabolic activity, biomass and susceptibility to AMB compared to the control biofilm. PMZ completely inhibited the growth of planktonic cells of *T. asahii* and *T. inkin* at concentrations ranging from 32 to 256 µg/ml. During the adhesion and development phases of biofilms, as well as in mature biofilms, there was a significant reduction in metabolic activity and biomass at the concentrations tested (MIC and 10x planktonic MIC). In the drug interaction test, it was observed that PMZ potentiated the action of AMB and FLC, *in vitro*, both in planktonic cells and in biofilms. PMZ affected the morphology of *Trichosporon*. and altered the carbohydrate and protein content of these communities. Additionally, mature biofilms pre-exposed to sub-inhibitory doses of PMZ produced fewer persister cells. The present study described, for the first time, the formation of persister cells in biofilms of *Trichosporon*. Furthermore, the inhibitory effect of PMZ on planktonic and sessile cells of *Trichosporon* was shown, as well as the changes induced by sub-inhibitory doses in biofilms. The results indicate that efflux inhibition is a promising strategy for the control of *Trichosporon*.

Keywords: Persister cells. *Trichosporon*. Antifungal Susceptibility. Biofilm. Promethazine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Micromorfologia celular e macromorfologia das colônias de *Trichosporon*. (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 colônias de coloração creme e branca, textura seca e relevo cerebriforme. (G) Teste da urease positivo (cor rosa) e negativo (cor amarela)..... 28
- Figura 2** – Micromorfologia celular de *Trichosporon*. (A) *T. ovoides*: hifas septadas, artroconídios, apressórios; (B) *T. inkin*: hifas septadas, apressórios e sarcinas; (C) *T. cutaneum*: hifas septadas, blastoconídios clavados; (D) *T. asteroides*: hifas septadas e crescimento meristemático; (E) *T. asahii*: hifas septadas e artroconídios; (F) *T. mucooides*: hifas septadas e blastoconídios clavados..... 29
- Figura 3** – Infecções superficiais causadas por *Trichosporon*. (A) Seta aponta múltiplos nódulos de coloração marrom-clara em volta dos cabelos; (B) Microscopia eletrônica de varredura mostrando nódulo maduro de *T. asahii* em cabelo; (C) Seta aponta nódulo envolvendo fio de cabelo (TrichoScan®); (D) Microscopia eletrônica de varredura mostrando nódulo imaturo de *T. asahii* em cabelo; (E) Onicomicose causada por *T. cacaoliposimilis* em diferentes estágios de tratamento com antifúngicos; (F) Artroconídios e blastoconídios de *T. cacaoliposimilis* corados com Zoomblue™ (x400); (G) Artroconídios e blastoconídios de *T. cacaoliposimilis* corados com ácido periódico de Schiff (x400); (H) Artroconídios em forma de barril corados com lactofenol azul de algodão (x400)..... 31
- Figura 4** – Representação esquemática dos possíveis fenótipos de virulência em biofilmes de *Trichosporon* sp. (densidade celular, resistência a estresses,

	células persistentes, matriz celular exopolimérica, bombas de efluxo, superexpressão de alvos farmacológicos, fisiologia).....	35
Figura 5 –	Etapas do desenvolvimento do biofilme. (1) Adesão reversível em superfície biótica ou abiótica; (2) Formação de microcolônias com início da produção da matriz celular exopolimérica; (3) Estabelecimento do biofilme maduro, em que as células estão interligadas pelo <i>quorum sensing</i> ; (4) Ruptura do biofilme por meio da ação das enzimas líticas, como proteases, com dispersão das células.	36
Figura 6 –	Fórmula estrutural da prometazina.....	44
Figura 7 –	Organograma e estruturação experimental deste estudo.....	49
Figura 8 –	Detecção de células persistentes em biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> - barras cinzas. (A) Biofilmes maduros formados em meio RPMI foram tratados com AMB (100 µg / ml). (B) Sobrevivência de biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> desafiados com AMB (100 µg / ml). Os controles de biofilme foram cultivados em meio RPMI sem drogas (barras pretas). Os valores são apresentados como média ± DP. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle livre de drogas (P <0,05)	60
Figura 9 –	Regeneração de biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> . Os biofilmes foram formados em meio RPMI e produzidos por células planctônicas (barras pretas), células destacadas de biofilmes maduros (barras cinza) ou células persistentes (barras brancas). (A) Atividade metabólica expressada como porcentagens relativas de absorbância pelos ensaios de redução de XTT. (B) Biomassa total expressada como porcentagens relativas de absorbância por coloração com cristal violeta. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao controle de crescimento do biofilme produzido pelas células planctônicas (P <0,05)	61

Figura 10 – Ultraestrutura de biofilmes maduros de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074) por MEV. (A, B) As células sésseis foram formadas em lâminas de Thermanox™ em meio RPMI sem drogas como controles. (C, D) Biofilmes maduros (48h) foram tratados com 100 µg / ml de AMB e incubados a 35 ° C por 24h, onde as células sobreviventes foram consideradas persistentes. Os biofilmes foram então raspados com uma ponta de pipeta e os inóculos foram preparados em meio RPMI, formando novos biofilmes. (E, F) Biofilmes de progênie produzidos por células persistentes. (G, H) Biofilmes de progênie formado por células destacadas de biofilmes maduros não tratados com drogas. Magnitude: 1000x..... 64

Figura 11 – Ultraestrutura de biofilmes maduros de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074) por CLSM. (A, B) As células sésseis foram formadas em lâminas de Thermanox™ em meio RPMI sem drogas como controles – biofilmes maduros. (C, D) Biofilmes maduros (48h) foram tratados com 100 µg / ml de AMB e incubados a 35 ° C por 24h, onde as células sobreviventes foram consideradas persistentes. Os biofilmes foram então raspados com uma ponta de pipeta e os inóculos foram preparados em meio RPMI, formando novos biofilmes. (E, F) Biofilmes de progênie produzidos por células persistentes. (G, H) Biofilmes de progênie formado por células destacadas de biofilmes maduros não tratados com drogas. As células vivas são mostradas em verde e as células mortas / danificadas são mostradas em amarelo / vermelho após a coloração com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente. Ampliação: 400x. Barra: 100 µm. 65

Figura 12 – Efeito da PMZ sobre a atividade metabólica e a biomassa de biofilmes de *T. asahii* (n=5) e *T. inkin* (n=7), expressos como porcentagens relativas da absorvância do ensaio de redução de MTT (A, B e D) e coloração com cristal violeta (C e E), respectivamente. (A) Efeito da PMZ na adesão de células de *Trichosporon* durante 6 h. (B e C) Efeito da PMZ no desenvolvimento do biofilme por 48 h. (D e E) Ação da PMZ sobre biofilmes maduros. Barras pretas representam controles de crescimento sem drogas; barras cinza representam biofilmes expostos à PMZ (MIC) e barras brancas representam

biofilmes expostos à PMZ ($10 \times \text{MIC}$). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * Diferenças estatisticamente significativas, quando em comparação com controles de crescimento sem drogas ($p < 0,05$) 68

Figura 13 – Efeito da PMZ em concentração subinibitória no aumento da sensibilidade de biofilmes maduros de *Trichosporon* frente a FLC ($40 \mu\text{g} / \text{ml}$) e AMB ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$). A atividade metabólica e a biomassa total foram expressas como porcentagens relativas de absorvância pela redução de MTT (A) e coloração por cristal violeta (B), respectivamente. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas – biofilme maduro; barras cinza com borda preta representa os biofilmes maduros expostos apenas a concentração subinibitória de PMZ ($8 \mu\text{g} / \text{ml}$); barras brancas com bordas pretas representam biofilmes maduros tratados apenas com AMB ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$); barras cinza-claras representam biofilmes maduros pré-exposto à PMZ ($8 \mu\text{g} / \text{ml}$) e, em seguida, expostos à AMB ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$); barras cinza-escuras representam biofilmes maduros tratados apenas com FLC ($40 \mu\text{g} / \text{ml}$) e barras cinzas correspondem a biofilmes maduros pré-exposto à PMZ ($8 \mu\text{g} / \text{ml}$) e, em seguida, expostos à FLC ($40 \mu\text{g} / \text{ml}$). Os valores foram apresentados como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * 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 PMZ/ATF ($p < 0,05$)..... 69

Figura 14 – Sobrevivência de células de biofilme maduro de *Trichosporon* pré-exposto a concentrações subinibitórias de PMZ ($8 \mu\text{g} / \text{ml}$ ou $16 \mu\text{g} / \text{ml}$) por 24h e AMB ($100 \mu\text{g} / \text{ml}$) por adicionais 24h. Os controles de biofilme foram cultivados em meio RPMI sem drogas (barras pretas). (A) As UFC foram expressas como porcentagens de sobrevivência. (B) Os dados do gráfico (A) foram representados em uma outra escala contendo apenas as células persistentes para melhor visualização dos resultados. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes

realizados em duplicata. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle livre de drogas (P <0,05). ** Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle tratado apenas com AMB 100 µg / ml (P <0,05) 70

Figura 15 – Efeito da PMZ (8 µg /ml) subinibitória e dos antifúngicos FLC (40 µg / ml) e AMB (10 µg / ml) na quantificação de carboidratos e proteínas de biofilmes de *Trichosporon*. Os carboidratos foram expressos como porcentagens relativas de fluorescência (430 nm / 510 nm) por coloração com calcofluor-white (A), porcentagens relativas de absorvância por safranina (630 nm) (C) e coloração com vermelho congo (490 nm) (D). As proteínas foram expressas como porcentagens relativas de fluorescência (465 nm / 630 nm) por coloração com SYPRO® Rubi (B). Os valores são apresentados como média ± erro padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * Diferenças estatisticamente significativas, quando comparadas com controles de crescimento sem drogas (p <0,05). # Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos indicados (p <0,05)..... 71

Figura 16 – 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 adição de PMZ. (C e D) Biofilme maduro de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, após exposição à CIM planctônica da PMZ, evidenciando comprometimento de sua estrutura. (E e F) Biofilme maduro desestruturado de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, após exposição à 10xCIM planctônica da PMZ. Setas pretas com bordas brancas sinalizam os canais de de passagem de água; setas brancas com borda preta indicam hifas finas, quebradiças e colabadas, com estrutura comprometida. Seta cinza com borda branca indica artroconídeos colabados. Magnitude: 1000x (A-D) e 3000x (E-F)..... 73

Figura 17 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074). (A e B, respectivamente) Controle de crescimento de biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, sem adição de PMZ. (C e D) Biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, após exposição à CIM planctônica da PMZ. (E e F) Biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, após exposição à 10x a CIM planctônica da PMZ. As células vivas são mostradas em verde e as células mortas / danificadas são mostradas em amarelo / vermelho após a coloração com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente. Ampliação: 400x..... 74

Figura 18 – Efeito da PMZ na espessura (a) e na intensidade de fluorescência média (b) de biofilmes maduros de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 analisados por microscopia confocal de varredura a laser. Barras pretas: controles livres de drogas cultivados em meio RPMI; barras cinzas: tratamento com PMZ (MIC planctônico); barras cinza clara: tratamento com PMZ (10×MIC planctônico). O gráfico (b) representa a intensidade colorimétrica de células vivas (verde) e células mortas/danificadas (vermelho) coradas com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente. *Diferenças estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle livre de drogas ($P < 0,05$). 75

Figura 19 – Efeito de PMZ no suposto alvo – bombas de efluxo – em *Trichosporon*. As células foram incubadas em meio RPMI suplementado com PMZ (0,25xMIC, barras cinzas; 0,125xMIC, barras brancas) e EtBr. A intensidade de fluorescência em relação aos controles livres de células (barras pretas) foi medida após 4h de exposição à PMZ. A acumulação de EtBr correlaciona-se com o aumento da fluorescência celular. *Diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos controles de crescimento sem drogas ($p < 0,05$)..... 76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Concentração inibitória mínima de anfotericina B (AMB) frente a células extraídas de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* produzidos em diferentes condições..... 62
- Tabela 2** – Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Trichosporon asahii* e *T. inkin* frente à prometazina (PMZ), anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLC)... 66
- Tabela 3** – Interação entre a prometazina (PMZ) e os antifúngicos anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLC) 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ABC	ATP-binding cassette
ATF	Antifúngico
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
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EtBr	Brometo de etídio
EUCAST	<i>European Commitee on Antibiotic Susceptibility Testing</i>
FLC	Fluconazol
GXM	Glucoronoxilomanana
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionária
IGS	<i>Intergenic Spaces</i>
IFIs	Infecções Fúngicas Invasivas
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITS	<i>Internal Transcriber Spacer</i>
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MEP	Matriz Extracelular Polimérica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSF	Major facilitator superfamily
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
PBS-Tween 20	Tampão de fosfato acrescido de Tween 20
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PMZ	Prometazina
rDNA	DNA ribossomal
rpm	Rotações por minuto
UFC	Universidade Federal do Ceará

UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H hidróxido de tetrazólio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	Infecções fúngicas invasivas (IFIs).....	24
2.2	O gênero <i>Trichosporon</i>.....	25
2.2.1	<i>Panorama histórico</i>.....	25
2.2.2	<i>Aspéctos morfofisiológicos e diagnóstico laboratorial</i>.....	27
2.2.3	<i>Patogenia e fatores de virulência</i>.....	31
2.2.4	<i>Biofilmes</i>.....	34
2.2.5	<i>Células persistentes</i>.....	37
2.2.6	<i>Bombas de efluxo</i>.....	39
2.2.7	<i>Sensibilidade aos antifúngicos</i>.....	40
2.3	Prometazina	43
3	HIPÓTESES.....	46
4	OBJETIVOS.....	47
4.1	Objetivo geral.....	47
4.2	Objetivos específicos.....	47
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1	Local de estudo.....	48
5.2	Microrganismos.....	48
5.3	Desenho experimental.....	48
5.4	Drogas.....	50
5.5	Ensaio para detecção de células persistentes.....	50
5.6	Ensaio para formação de biofilmes a partir de células persistentes.....	51
5.7	Teste de sensibilidade de células persistentes, células sésseis e células planctônicas à AMB.....	51
5.8	Microscopia eletrônica de varredura.....	52
5.9	Microscopia confocal de varredura a laser.....	53
5.10	Análise estatística.....	53
5.11	Teste de sensibilidade planctônica.....	54
5.12	Testes em biofilmes	55
5.12.1	<i>Teste de sensibilidade em biofilmes</i>	55

5.12.2	<i>Teste de interação da PMZ com antifúngicos em biofilme maduro</i>	56
5.12.3	<i>Ensaio de formação de células persistentes em biofilmes tratados com PMZ</i>	56
5.12.4	<i>Quantificação de carboidratos e proteínas após exposição à PMZ</i>	57
5.12.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	57
5.12.6	<i>Microscopia confocal de varredura a laser</i>	58
5.12.7	<i>Ensaio de inibição de efluxo</i>	58
5.12.8	<i>Análise estatística</i>	59
6	RESULTADOS	60
6.1	Presença de células persistentes em biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	60
6.2	Células persistentes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> podem formar novos biofilmes	61
6.3	Células persistentes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> apresentaram tolerância à AMB	61
6.4	Ultraestrutura dos biofilmes	62
6.5	Efeito da PMZ sobre o crescimento planctônico de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	66
6.6	Interação da PMZ com antifúngicos frente a células planctônicas de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	67
6.7	Efeito da PMZ sobre biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	67
6.8	Efeito da PMZ sobre a sensibilidade dos biofilmes aos antifúngicos	68
6.9	Ação da PMZ sobre a formação de células persistentes	69
6.10	Efeito da PMZ sobre a quantificação de carboidratos de proteínas em biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	70
6.11	Efeito da PMZ sobre a morfologia e a estrutura de biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	72
6.12	Efeito da Prometazina sobre o efluxo em <i>Trichosporon</i>	76
7	DISCUSSÃO	77
8	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE	98
	APÊNDICE A	98
	APÊNDICE B	123

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, infecções fúngicas invasivas (IFIs) têm aumentado sua frequência e se tornaram um problema de saúde pública (ANDES et al., 2016; REVIE et al., 2018). Dentre as populações mais afetadas, estão os pacientes transplantados, indivíduos infectados pelo vírus HIV e demais grupos com imunocomprometimento, onde as IFIs costumam apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade (REVIE et al. 2018; BITTERMAN, MARINELLI E HUSAIN, 2021).

Dentre os principais fungos oportunistas causadores de IFIs estão os gêneros: *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* (BITTERMAN, MARINELLI E HUSAIN, 2021). Além deles, *Trichosporon* tem se destacado em infecções sistêmicas como um fungo emergente, sendo apontado como a segunda maior causa de infecções invasivas originadas por leveduras em pacientes com doenças hematológicas malignas (DE ALMEIDA JÚNIOR E HENNEQUIN, 2016).

Trichosporon sp. caracteriza-se por ser ubíquo, podendo habitar o solo, a água, e diversos animais, incluindo os humanos, onde é comumente encontrado na microbiota da pele e do trato gastrointestinal (GUO et al., 2019). Sua capacidade invasiva está diretamente relacionada aos fatores de virulência que esse gênero fúngico é capaz de expressar, dentre eles: diferenciação em hifas, produção de enzimas líticas (DNAase, fosfolipase, proteases) e formação de biofilmes (MONTROYA et al. 2018; HAZIROLAN, KOÇAK, KARAGÖZ, 2018). Esta última característica associada a um quadro de imunossupressão é fator importante na falha terapêutica e em óbito de pacientes com tricosporonose invasiva (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Além disso, *Trichosporon* apresentam resistência intrínseca às equinocandinas e, eventualmente, sensibilidade reduzida à anfotericina B e azólicos, o que evidencia um desafio no tratamento empírico (SINGH et al., 2019). Outra característica importante já relatada para diversos fungos patogênicos e que pode estar relacionada à tolerância de *Trichosporon* a antifúngicos é a presença de células persistentes, as quais permanecem dormentes quando submetidas a altas concentrações de fármacos e, cessado o estresse, são capazes de reativar e permanecer viáveis (LI et al., 2015; REICHHARDT et al., 2016). Porém, apesar de relevante, esse mecanismo ainda não foi bem descrito na literatura.

Tendo em vista a gravidade das infecções sistêmicas e a crescente resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados na clínica, a busca por novas estratégias terapêuticas tem sido crescente (LAGADINOU et al., 2020). Para isso, é preciso um conhecimento aprofundado

sobre os fatores de virulência do fungo e seus potenciais alvos farmacológicos, como biofilmes, bombas de efluxo e células persistentes (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; ABBES et al., 2021; MEHTA et al., 2021).

Dentre as substâncias atualmente pesquisadas em estudos de sensibilidade antimicrobiana, destaca-se a prometazina, um anti-histamínico do grupo das fenotiazinas, com ação inibitória sobre bombas de efluxo, a qual tem apresentado significativo efeito antimicrobiano sobre diversos fungos e bactérias: *Burkholderia pseudomallei* (SIDRIM et al., 2017), *Microsporium canis* (ANEKE et al., 2020), *C. tropicalis* (BRILHANTE et al., 2018), complexo de espécies *Fusarium solani* (CORDEIRO et al., 2020), dentre outros.

Nesse contexto, no presente trabalho, investigou-se a presença de células persistentes em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, bem como as características gerais dessas células, como: sensibilidade à anfotericina B *in vitro* e a capacidade de reativar e produzir novos biofilmes. Além disso, o estudo analisou a ação da prometazina sobre células planctônicas e sésseis e seu impacto na formação de células persistentes de *T. asahii* e *T. inkin*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções fúngicas invasivas (IFIs)

Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) são a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (RUHNKE et al., 2018). Recentemente, tem-se verificado o aumento na incidência dessas infecções, com uma prevalência de mais de um milhão de casos ao redor do mundo, afetando sobretudo pacientes portadores de malignidades hematológicas (RUHNKE et al., 2018; PAPON, BOUGNOUX, D'ENFERT, 2020).

Diversos fatores podem influenciar no desenvolvimento de IFIs, dentre eles comorbidades como diabetes, câncer e infecções pelo vírus HIV (PAPON, BOUGNOUX, D'ENFERT, 2020; VON LILIENFELD-TOAL et al., 2019). Ademais, pacientes neutropênicos, transplantados, internados por longos períodos ou que se submetem a longos tratamentos com imunossupressores e corticóides também se encontram no grupo de risco (SINGH et al., 2019; VON LILIENFELD-TOAL et al., 2019).

Os fungos patogênicos mais comumente relacionadas com as IFIs são *Candida* sp., *Aspergillus* sp. e *Cryptococcus* sp., os quais podem provocar quadros infecciosos mais graves com uma taxa de 20 a 50% de óbitos, apesar do tratamento com potentes antifúngicos (PAPON, BOUGNOUX, D'ENFERT, 2020). Porém, um crescente número de outros gêneros tem se destacado neste cenário, como *Rhodotorula* sp., *Fusarium* sp. e *Trichosporon* sp. (RUHNKE et al., 2018; VON LILIENFELD-TOAL et al., 2019).

Em geral, esses fungos são heterogêneos e pertencem a diferentes nichos (RUHNKE et al., 2018; HALLEN-ADAMS E SUHR, 2016). Sua diversidade morfofisiologia representa um desafio para o diagnóstico laboratorial precoce, o que associado ao quadro clínico dos pacientes pode gerar um impacto negativo no prognóstico da doença (RUHNKE et al., 2018). O ponto em comum entre eles é que são caracterizados como oportunistas, pois raramente apresentam infecções graves em pessoas imunocompetentes, porém, em indivíduos com sistema imunológico debilitado, encontram uma porta de entrada para se instalar e provocar as IFIs (VON LILIENFELD-TOAL et al., 2019; PAPON, BOUGNOUX, D'ENFERT, 2020).

Dentre os principais fatores de risco para o surgimento de IFIs causadas por *Trichosporon*, estão: uso de dispositivos médicos invasivos, doenças hematológicas, longos períodos de internação, uso de corticosteróides e tratamento com antibiótico por longos períodos (SINGH et al., 2019; LI et al., 2020). Porém, casos de tricosporonose invasiva também têm sido observados em pacientes imunocompetentes, geralmente, quando associados à disbiose ou a outras comorbidades, como

insuficiência cardíaca, diabetes e doença renal (DE ALMEIDA JÚNIOR e HENNEQUIN, 2016; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; ALP et al., 2020; PAPON, BOUGNOUX, D'ENFERT, 2020).

Em se tratando de fungos emergentes, o gênero *Trichosporon* sp. tem se destacado como a segunda maior causa de infecções sistêmicas originadas por leveduras em pacientes com doenças hematológicas malignas (ALMEIDA JR E HENNEQUIN, 2015). Como agravante, a tricosporonose invasiva representa um desafio, tanto para o diagnóstico da doença, quanto para o isolamento do fungo e a caracterização a nível de espécie, apresentando, também, multirresistência aos antifúngicos comumente utilizados na clínica e altas taxas de mortalidade nos pacientes acometidos, por isso a importância crescente do estudo deste fungo e de seus fatores de virulência (SAH et al., 2019; SINGH et al., 2019).

2.2 O gênero *Trichosporon*

2.2.1 Panorama histórico

Em 1865, em Londres, Beigel observou a presença de nódulos brancos em perucas de cabelo humano, descrevendo a “doença dos *chignons*” o que seria consequência de uma infecção fúngica chamada de *pedra* branca (BEIGEL, 1869 *apud* FONSECA, 1930). Acredita-se que esse episódio tenha sido o primeiro em que o agente etiológico, anos mais tarde denominado *Trichosporon*, foi primeiramente descrito (SIDRIM e ROCHA, 2004; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011).

Em 1866, Ernst Hallier confirmou a origem fúngica do isolado e o classificou como *Sclerotium beigelii*, em homenagem a Beigel (SIDRIM e ROCHA, 2004; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011). Em 1867, Rabenhorst, um botânico e micologista alemão, isolou dos cabelos de uma peruca o que acreditava ser uma alga, denominando de *Pleurococcus beigelii* (RABENHORST, 1867 *apud* GUÉHO et al., 1992). Após três anos, o dermatologista alemão Gustav Behrend isolou um fungo da barba de um paciente com *pedra* branca e o classificou como *Trichosporon ovoides* (BEHREND, 1890).

É importante salientar que o nome *Trichosporon* foi originado do grego, em uma combinação de *Trichos* (cabelo) e esporo (esporos), devido ao aspecto do referido fungo, comumente isolado de barba e cabelo (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011). Em 1902, Vuillemin, um micologista francês, baseado nos estudos prévios de Behrend, afirmou que as diversas espécies propostas e definidas até o momento eram apenas variações fenotípicas de uma mesma espécie, a qual denominou *Trichosporon beigelii* (KREGER-VAN RIJ, 1984; VUILLEMIN 1902 *apud* GUÉHO, DE HOOG e SMITH, 1992).

Em 1910, fungos obtidos de lesões de pele e cultivados pelo dermatologista francês Beurmann foram nomeados de *Oidium cutaneum*, o qual posteriormente recebeu a denominação de

Trichosporon cutaneum, por Ota (1926), nome dado devido sua origem na pele humana (BEURMANN, GOUGEROT e VAUCHER, 1910; OTA, 1926). Em 1976, Restrepo e Uribe, pesquisadores da Colômbia, de forma inovadora, sugeriram que *Trichosporon* poderia, também, causar infecção em unhas (RESTREPO e URIBE, 1976).

Após quase uma década, em 1984, Fusaro e Miller relataram o primeiro caso de onicomicose causada por *Trichosporon* sp. como infecção fúngica benigna em um homem imunocompetente proveniente dos Estados Unidos (FUSARO e MILLER, 1984). Posteriormente, os isolados clínicos de *Trichosporon* foram identificados como *Trichosporon beigelii* ou seu sinônimo *Trichosporon cutaneum* (KREGER-VAN RIJ, 1984; GUÉHO et al., 1994; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011).

Entretanto, com os avanços das técnicas de identificação molecular, a taxonomia do gênero *Trichosporon* foi revisada e, em 1992, a micologista francesa Eveline Guého e colaboradores realizaram um amplo estudo das características morfológicas, ultra-estruturais, fisiológicas e moleculares de 101 isolados oriundos de amostras clínicas e ambientais e identificaram diversas espécies, levando à extinção do termo *Trichosporon beigelii*, que era uma nomenclatura generalista utilizada erroneamente para caracterizar as diferentes espécies de *Trichosporon* (GUÉHO et al., 1992).

Adicionalmente, pela mesma equipe de pesquisadores, as espécies *T. asahii*, *T. inkin*, *T. ovoides*, *T. asteroides*, *T. cutaneum* e *T. mucoides* foram destacadas como as mais patogênicas até então conhecidas, pois, além da sua capacidade de causar infecções superficiais, também se relacionavam com micoses invasivas (localizadas ou disseminadas), sobretudo em pacientes clinicamente debilitados, especialmente os acometidos de neoplasia hematológica, imunossupressão, ou internados por longos períodos (GUÉHO et al., 1994; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011).

Em 2014, devido ao aumento de informações e ao avanço nos estudos sobre a diversidade biológica das espécies de *Trichosporon*, este gênero fúngico foi subdividido entre os clados Ovoides, Cutaneum, Porosum e Gracile/Brassicae, compreendendo 51 espécies, sendo 17 clinicamente mais relevantes: *T. asahii*, *T. inkin*, *T. cutaneum*, *T. ovoides*, *T. mucoides*, *T. asteroides*, *T. jirovecii*, *T. mycotoxinovorans*, *T. dermatis*, *T. loubieri*, *T. montevidense*, *T. domesticum*, *T. japonicum*, *T. coremiiforme*, *T. dohaense*, *T. lactis*, *T. faecale* (TAVERNA et al., 2014; MARINÉ et al., 2015a).

Em 2015, pesquisadores revisaram a taxonomia do gênero *Trichosporon*, baseados em análise filogenética molecular, e sugeriram novos gêneros para os clados monofiléticos, incluindo: *Trichosporon*, *Cutaneotrichosporon* e *Apiotrichum*, os quais estão sendo amplamente utilizados na literatura científica atual (LIU et al., 2015; TAKASHIMA e SUGITA, 2019; DO ESPÍRITO SANTO

et al., 2020). Os gêneros citados englobam as espécies multirresistentes aos antifúngicos utilizados na clínica, apresentando grande relevância científica (DE ALMEIDA JÚNIOR et al., 2017; TAKASHIMA M e SUGITA, 2019; DO ESPÍRITO SANTO et al., 2020).

2.2.2 Aspéctos morfofisiológicos e diagnóstico laboratorial

Taxonomicamente, os gêneros *Trichosporon*, *Cutaneotrichosporon* e *Apiotrichum* correspondem a fungos que pertencem ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Tremellomycetes, ordem Trichosporonales, família Trichosporonaceae (LIU et al., 2015; DO ESPÍRITO SANTO et al., 2020).

Atualmente, mais de 50 espécies de *Trichosporon* já foram descritas, sendo 17 consideradas patogênicas para os seres humanos, as quais estão distribuídas da seguinte forma: gênero *Trichosporon* (*T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. japonicum*, *T. coremiiforme*, *T. dohaense*, *T. lactis*, *T. faecale*), gênero *Cutaneotrichosporon* (*C. cutaneum*, *C. jirovecii*, *C. mucoides*, *C. dermatis*, *C. debeumannianum*), e gênero *Apiotrichum* (*A. loubieri*, *A. mycotoxinovorans*, *A. montevideense*, *A. domesticum*) (MARINÉ et al., 2015^a; LIU et al., 2015; DE ALMEIDA JÚNIOR et al., 2017).

Trata-se de fungos basidiomicetos leveduriformes, apresentando características morfológicas variadas, como blastoconídeos (células globosas simples, ovóides ou elipsoidais - Figura 1 A), artroconídeos (cadeias de células, esporos assexuados resultantes da divisão das hifas - Figura 1 D), hifas verdadeiras septadas hialinas (Figura 1 D) e pseudohifas hialinas (Figura 1 B), e o processo reprodutivo ocorre de forma assexuada (CHAGAS-NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008; MARINÉ et al., 2015^a; KURAKADO et al., 2021). Por outro lado, determinadas espécies possuem estruturas morfológicas diferenciadas, as quais auxiliam em sua caracterização fenotípica, como apressórios (Figura 1 C), sarcinas (Figura 2 B) e conidiação meristemática (Figura 2 D).

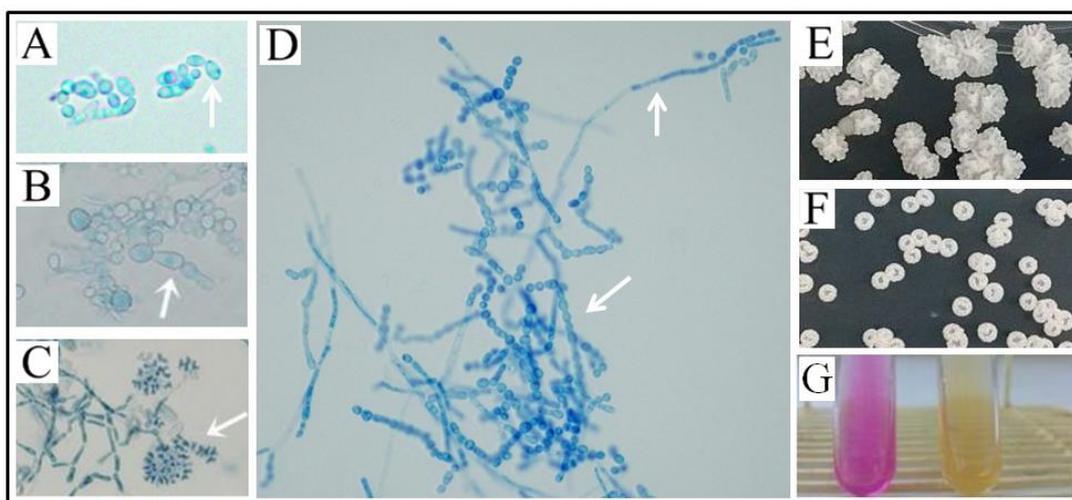


Figura 1. Micromorfologia celular e macromorfologia das colônias de *Trichosporon*. (A) Seta aponta blastoconídeos; (B) Seta aponta pseudo-hifa; (C) Seta aponta presença de apressório em *T. inkin*; (D) Setas apontam arthroconídeos e hifa verdadeira septada hialina. Morfofolia das colônias de *T. asahii* (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: Aguiar (2018).

Em ágar Sabouraud dextrose, cepas de *Trichosporon* sp. crescem de 2 a 7 dias, em temperatura de 35°C (ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014). Suas características macromorfológicas podem variar intra e interespecies, podendo apresentar colônias úmidas ou secas, de coloração branca a creme (Figura 1- E e F), inicialmente claras e se tornando mais escuras à medida que envelhecem (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017). A topografia pode ser plana, ou cerebriforme, ou umbilicada com depressão central lembrando a forma de cratera de vulcão, e a superfície pode ser lisa, rugosa ou de aspecto farináceo (DE HOOG et al., 2000).

Quanto aos aspectos fisiológicos e bioquímicos, as espécies de *Trichosporon* também apresentam variações, assimilando diferentes tipos de carboidratos, como monossacarídeos (pentoses e hexoses), dissacarídeos (celobiose, lactose, maltose, melibiose, sacarose, trealose), bem como polissacarídeos (amido e xilano) (LIU et al., 2015; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, também podem metabolizar outras fontes de carbono, como compostos aromáticos (fenol, cresol, aminoácidos aromáticos, benzoatos esalicilatos) e fontes de nitrogênio, neste caso em virtude da ação da enzima urease dependente de níquel, o que os torna aptos a metabolizar a ureia em amônia e carbamato, sendo positivo no teste da urease (Figura 1-G). Porém, de maneira geral, esses fungos não são capazes realizar fermentação de açúcares, apresentando apenas o metabolismo oxidativo (LIU et al., 2015; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

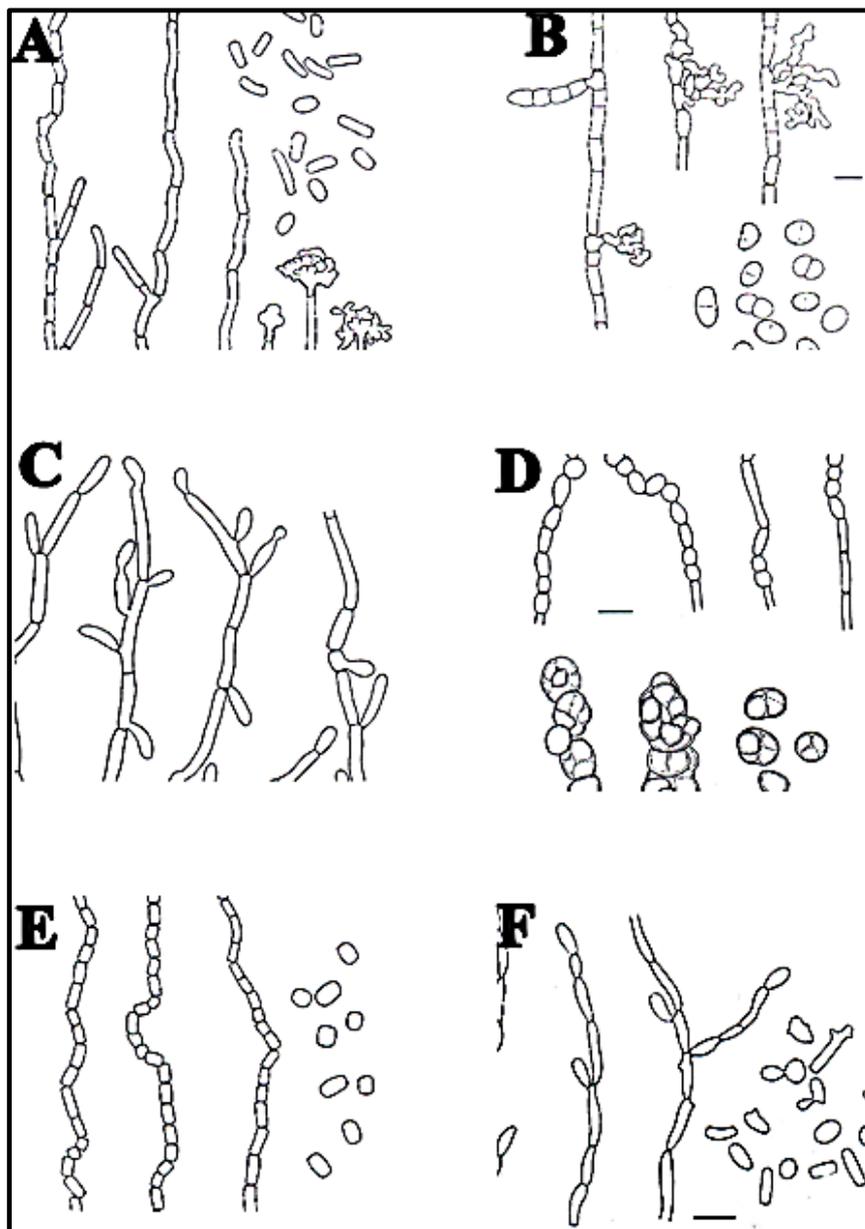


Figura 2. Micromorfologia celular de *Trichosporon*. (A) *T. ovoides*: hifas septadas, artroconídios, apressórios; (B) *T. inkin*: hifas septadas, apressórios e sarcinias; (C) *T. cutaneum*: hifas septadas, blastoconídios clavados; (D) *T. asteroides*: hifas septadas e crescimento meristemático; (E) *T. asahii*: hifas septadas e artroconídios; (F) *T. mucoides*: hifas septadas e blastoconídios clavados Fonte: Magalhães (2008).

Provavelmente devido à sua diversidade micro e macromorfológica e às suas características metabólicas e fisiológicas, esse gênero fúngico é amplamente distribuído na natureza, adaptando-se a ambientes tropicais e temperados, podendo estar presentes em solo, água, madeiras em decomposição e excreta de animais (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Nos seres humanos, podem fazer parte da microbiota permanente da mucosa oral e do trato gastrointestinal, assim 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; HALLEN-ADAMS E SUHR, 2016). O fato de estarem presentes no corpo humano, colonizando diferentes sítios anatômicos, contribui para a ocorrência de infecções oportunistas, passando do estado comensal a patogênico, principalmente no hospedeiro imunocomprometido (HALLEN-ADAMS E SUHR, 2016; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; SINGH et al., 2019).

A variabilidade nos padrões bioquímicos, metabólicos e morfológicos anteriormente descritos contribuem para a distinção entre as espécies de *Trichosporon*, auxiliando no diagnóstico laboratorial, porém podem gerar resultados contraditórios, não sendo totalmente confiáveis (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017). Por isso, a utilização de métodos de identificação por galerias, como API®/ ID32 (Biomerieux, França) e VITEK® MS™ (Biomerieux, França), bem como métodos de identificação moleculares estão cada vez mais sendo utilizados na prática clínica laboratorial (RUAN, CHIEN e HSUEH, 2009; DE ALMEIDA JÚNIOR et al., 2017; RUHNKE et al., 2018).

Visto que as IFIs causadas por *Trichosporon*. não cursam com sinais / sintomas patognomônicos, as metodologias mais seguras atualmente para a identificação de suas espécies, são as que utilizam amplificação de genes ribossomais por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) associada ao sequenciamento de regiões intergênicas ITS (*Internal Transcriber Spaces*), como a ITS1 localizada entre as regiões 18S e 5.8S, ou a IGS (*Intergenic Spaces*) dos genes 26S e 5S do DNA ribossomal (rDNA), ou análise do domínio D1/D2 das regiões 26S do gene RNA (DABAS, XESS e KALE, 2017; RUHNKE et al., 2018; DO ESPÍRITO SANTO et al., 2020).

Outro recurso diagnóstico atualmente utilizado e que possui elevada acurácia e rapidez é a espectrometria de massa, a qual utiliza a técnica de ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALDI- TOF) para separar os íons de diferentes pesos/massas, empregando análise proteômica como meio para identificação fúngica, porém é uma técnica que demanda elevados recursos financeiros e equipe técnica especializada (DE ALMEIDA JÚNIOR et al., 2014; WANG et al., 2016; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Apesar de a tricosporonose invasiva ainda ser uma doença negligenciada, nos últimos anos tem-se visto um aumento na detecção do fungo, principalmente devido ao avanço das técnicas diagnósticas e das pesquisas científicas, que têm permitido o isolamento e a identificação de *Trichosporon* a nível de espécie, bem como a caracterização de seus fatores de virulência (DE ALMEIDA JÚNIOR e HENNEQUIN, 2016; GUO et al., 2019; LI et al., 2020).

2.2.3 Patogenia e fatores de virulência

Infecções por *Trichosporon* podem ter origem endógena, quando o fungo já faz parte da microbiota do hospedeiro, ou exógena, quando o indivíduo se infecta no ambiente, pelo contato com outras pessoas ou por meio de dispositivos médicos intracorpóreos (HALLEN-ADAMS E SUHR, 2016; SINGH et al., 2019). São frequentemente associadas a infecções superficiais benignas, como *pedra* branca (Figura 3 A) e onicomicoses (Figura 3 B), e a infecções invasivas localizadas ou disseminadas, principalmente em indivíduos com imunocomprometimento (NOGUCHI et al., 2020; BIEBER, POMERANZ e KIM, 2021; SINGH et al., 2019).

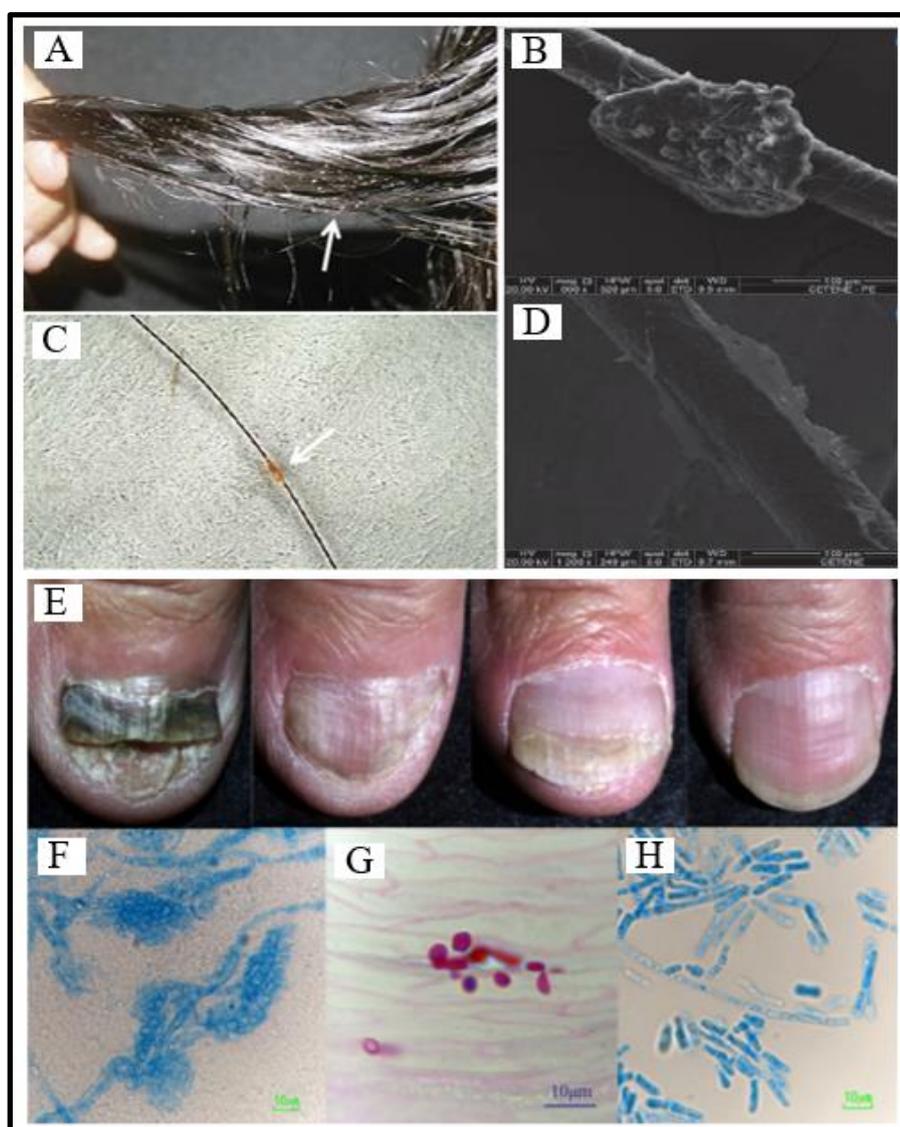


Figura 3. Infecções superficiais causadas por *Trichosporon*. (A) Seta aponta múltiplos nódulos de coloração marrom-clara em volta dos cabelos; (B) Microscopia eletrônica de varredura mostrando nódulo maduro de *T. asahii* em cabelo; (C) Seta aponta nódulo envolvendo fio de cabelo (TrichoScan®); (D) Microscopia eletrônica de varredura mostrando nódulo imaturo de *T. asahii* em

cabelo; (E) Onicomicose causada por *T. cacaoliposimilis* em diferentes estágios de tratamento com antifúngicos; (F) Artroconídios e blastoconídios de *T. cacaoliposimilis* corados com Zoomblue™ (x400); (G) Artroconídios e blastoconídios de *T. cacaoliposimilis* corados com ácido periódico de Schiff (x400); (H) Artroconídios em forma de barril corados com lactofenol azul de algodão (x400). Fonte: Adaptado de Sandoval-Tress, Arenás-Guzmán e Guzmán-Sánchez (2015); Inácio et al., 2016 e Noguchi et al., 2020.

A *pedra* branca se caracteriza pela presença de nódulos irregulares, de cor branca ou marrom clara, ao longo dos pêlos (barba, axila e área genital) e cabelos afetados (SANDOVAL- TRESS, ARENÁS-GUZMÁN e GUZMÁN-SÁNCHEZ, 2015; BIEBER, POMERANZ e KIM, 2021). Nesses casos, as espécies mais comumente isoladas são: *T. inkin*, *T. cutaneum*, *T. ovóides*, *T. loubieri* (SANDOVAL- TRESS, ARENÁS-GUZMÁN e GUZMÁN-SÁNCHEZ, 2015). Por outro lado, as principais espécies envolvidas em casos de onicomicoses são: *T. asahii*, *T. mucoides* e *T. inkin* (NOGUCHI et al., 2020), podendo, também, outras espécies patogênicas também serem isoladas desse sítio: *T. cutaneum* e *T. ovóides*, *T. asahii* e *T. asteroides* (KOTWAL et al. 2018; MAGALHÃES et al., 2016).

Em uma revisão sistemática feita por Li e colaboradores (2020), analisou-se os casos de infecção por *T. asahii* relatados durante os últimos 23 anos, onde observou-se que, dos 140 casos de infecções, 35% eram infecção urinária, 33% fungemia, 20% infecção disseminada, 15% infecção pulmonar, 2% meningoencefalite, 1% endocardite, dentre outras, geralmente em pacientes com comorbidades ou com condições que favoreciam a infecção por fungos (LI et al., 2020). O estudo mostrou que *T. asahii* está bastante envolvida em infecções invasivas e apresenta alta virulência, representando grande relevância clínica e epidemiológica (LI et al., 2020).

Um trabalho mais antigo, porém com elevada importância, investigou a epidemiologia da fungemia causada por *Trichosporon* entre os anos de 1995 e 2014 e relatou 185 casos distribuídos pela América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa (LIAO et al., 2015). No estudo, foi constatado que a incidência de tricosporonose invasiva tem aumentado consideravelmente nos últimos quarenta anos, sendo os principais fatores de risco: uso de antimicrobianos (84,05%), história de neutropenia (60,49%), tratamento quimioterápico (58,44%), doenças hematológicas (57,4% dos pacientes, em que 77,36% destes tinham leucemia aguda), uso de cateter venoso central (52,1%), terapia antifúngica profilática (43,24%), história de terapia com corticosteróides (22,0%) e nascimento prematuro (7,57%).

O sucesso da invasão tecidual por fungos do gênero *Trichosporon* se deve não somente à condição clínica debilitada dos pacientes, mas, também, aos fatores de virulência do fungo, os quais correspondem ao conjunto de todas as características que permitem a evasão dos sistemas de defesa

do hospedeiro (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017). Em pacientes imunocompetentes, porém, com algum fator associado, como disbiose, tratamento prévio com antibióticos, ou comorbidades, como diabetes, também são mais propensos a desenvolver tricosporonose invasiva (LIAO et al., 2015; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Nesse contexto, *Trichosporon* podem expressar diversos fatores de virulência: diferenciação em hifas, produção de glucuronoxilomanana (GXM) na parede celular, termotolerância, a produção de enzimas extracelulares, o *switching* fenotípico morfológico das colônias, expressão de genes resistentes a antifúngicos, a capacidade de se associar na forma de biofilme e, mais recentemente, a formação de células persistentes (BENTUBO et al., 2014; MARINÉ et al., 2015b; MONTOYA et al., 2017; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Em *Trichosporon* sp., a capacidade de formar hifas é um importante fator associado à invasão tecidual, contribuindo para a disseminação fúngica e para a potencialização das infecções (MARINÉ et al., 2015a). Estudos revelam a ocorrência de embolia vascular em pacientes com tricosporonose invasiva, o que ocorre devido à angioinvasão pelas hifas, seguido de infarto multifocal e falência dos órgãos acometidos (TAMAYO et al., 2015; ZUO et al., 2015; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; MADA et al., 2018).

Outro fator de virulência é a produção de melanina, na presença do precursor L-DOPA, a qual protege as células fúngicas contra estresse oxidativo e contra a fagocitose, entretanto essa característica ainda não está amplamente elucidada para a diversidade de espécies de *Trichosporon* sp. (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2014). Já o *switching* fenotípico morfológico é a mudança nas características macroscópicas das colônias e está relacionado com a adesão celular em *T. asahii* (ICHIKAWA et al., 2004).

A produção de exoenzimas líticas favorece o dano tecidual, contribuindo para o estabelecimento do parasitismo do hospedeiro e para a disseminação do fungo (ALMEIDA et al., 2016; HAZIROLAN, KOÇAK E KARAGÖZ, 2018). Dentre as principais enzimas produzidas por *Trichosporon* sp. estão: proteases, lipases, fosfolipases, DNase, estearases e hemolisinas que, além de degradar proteínas de defesa do hospedeiro, contribuem para a obtenção de nutrientes (MARINÉ, 2015^a; GABRIELLI et al., 2016; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; HAZIROLAN, KOÇAK E KARAGÖZ, 2018).

A glicuronoxilomanana (GXM), formada 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, semelhante ao produzido por *Cryptococcus neoformans*, apresenta função estrutural como componente da parede celular de *Trichosporon*, exercendo, também, função antigênica, dificultando a fagocitose por neutrófilos e macrófagos (COLOMBO et al., 2011; MARINÉ et al., 2015b).

A característica de se aderir a superfícies e formar biofilmes tanto em dispositivos médicos intracorpóreos, bem como em tecidos, é um importante fator de virulência que contribui para a sobrevivência de *Trichosporon* em diferentes sítios do hospedeiro, facilitando sua disseminação e potencializando o processo infeccioso (ALMEIDA et al., 2016; MONTOYA et al., 2018; MEHTA et al. 2021). Por fim, a formação de células persistentes tem se apresentado como uma possível causa de infecções crônicas e menos responsivas aos antifúngicos, pois permanecem dormentes sob condições de estresse, mas, posteriormente conseguem reativar e manter o seu metabolismo (LI et al., 2017; PADOVAN et al., 2019).

2.2.4 Biofilme

Como já abordado anteriormente, para que o processo infeccioso ocorra, é necessário que as células de *Trichosporon* ultrapassem diversos desafios impostos pelo ambiente, como estresses químicos e físicos, bem como o sistema imune do hospedeiro (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; MEHTA et al. 2021). Por isso, a organização em forma de biofilmes é uma característica tão importante, visto que permite a sobrevivência do fungo diante de todos esses obstáculos (FLEMMING et al., 2016; MONTOYA et al., 2018).

Biofilmes são comunidades microbianas extremamente organizadas e complexas, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica e envoltas por uma matriz celular exopolimérica (MEP) constituída em maior quantidade por água (em torno de 97%) e em menor proporção por carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (FLEMMING et al., 2016; REICHHARDT et al., 2016). A matriz extracelular apresenta funções químicas, nutricionais e estruturais, conferindo ao biofilme proteção contra a ação de fármacos e do sistema imune do hospedeiro (REICHHARDT et al., 2016).

Nos biofilmes, as células se comunicam através de moléculas sinalizadoras pertencentes a um sistema denominado *quorum sensing*, as quais garantem a comunicação celular, produzem numerosas moléculas extracelulares, detectam a densidade populacional, regulam o desenvolvimento do biofilme, modulam a expressão gênica de fatores de virulência e expressam mecanismos de resistência aos antimicrobianos, permitindo a sobrevivência dos biofilmes em um ambiente inóspito (CORDEIRO et al., 2019a; KOVÁCS E MAJOROS, 2020). Adicionalmente, expressam *agglutinin-like genes* (ALS), cujos produtos contribuem para a adesão às células do hospedeiro, favorecendo a formação de novos biofilmes (GULATI e NOBILE, 2016).

Estima-se que 80% de todos os microrganismos crescem aderidos a uma superfície e organizados em comunidades sésseis em comparação à forma planctônica e que grande parte das infecções microbianas derivam de biofilmes patogênicos (POLKE et al., 2015). Tal fato pode ser devido às vantagens da associação em biofilmes: maior expressão de fatores de virulência, cooperação

metabólica, mecanismos de resistência contra estresses físicos e químicos do ambiente, como expressão de bombas de efluxo e células dormentes (Figura 4) (RAMAGE et al., 2012; GABRIELLI et al., 2016). Por isso, por volta de 65% das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e 80% de todas as infecções microbianas são originadas a partir da formação de biofilmes (RÖMLING e BALSALOBRE, 2012).

Em grande parte dos casos, as células fúngicas já fazem parte da microbiota do indivíduo e, encontrando uma condição que favoreça sua disseminação, como uso de corticosteróides e antibióticos ou dispositivos médicos invasivos (Ex: cateter venoso central), conseguem se instalar e formar biofilmes, promovendo infecções de difícil tratamento. Em adição, outros fatores podem contribuir para o surgimento de IFIs e formação de biofilmes por *Trichosporon*, como queimaduras (TAMAYO et al., 2015) e cirurgia (MADA et al., 2018), com agravamento do quadro clínico dos pacientes.

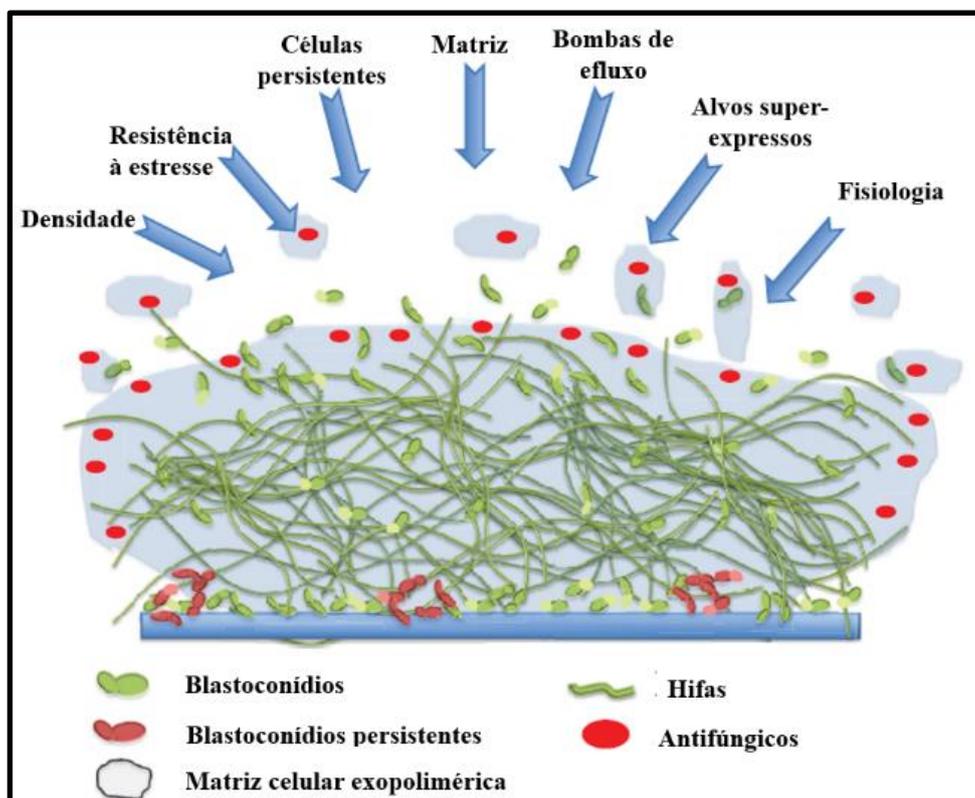


Figura 4. Representação esquemática dos possíveis fenótipos de virulência em biofilmes de *Trichosporon* sp. (densidade celular, resistência a estresses, células persistentes, matriz celular exopolimérica, bombas de efluxo, superexpressão de alvos farmacológicos, fisiologia). Fonte: Adaptado de Ramage et al., (2012).

Com base em dados epidemiológicos, tem-se que a espécie mais frequentemente isolada é no caso de tricosporonose invasiva é *T. asahii* (MONTROYA et al., 2018; PADOVAN et al., 2019; LI et al., 2020; MEHTA et al. 2021). *T. inkin* é a segunda espécie mais comumente associada a tricosporonose invasiva, isolada de amostras clínicas como urina, sangue e cateteres (DE ALMEIDA

JÚNIOR & HENNEQUIN, 2016). Entretanto, mesmo em menor frequência, outras espécies também podem ser associadas a casos mais graves, invasivos e de difícil tratamento, como: *T. mucoïdes*, *T. asteroides*, *T. loubieri*, *T. ovoides*, *T. cutaneum*, *T. coremiiforme*, *T. dermatis* e *T. mycotoxinivorans* (LIAO et al., 2015; DE ALMEIDA JÚNIOR & HENNEQUIN, 2016).

Os primeiros pesquisadores que relataram a capacidade de formação de biofilmes por células de *Trichosporon* sp. foram Di Bonaventura e colaboradores, em 2006, o qual comprovaram a adesão de *T. asahii* em superfície de poliestireno e concluíram que esse fungo, além de ser apto a formar biofilme, pode gerar infecções persistentes e com alta tolerância a fármacos (DI BONAVENTURA et al., 2006). Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados para propor mecanismos de resistência a esses biofilmes e desvendar seus aspectos morfofisiológicos e estruturais (CORDEIRO et al., 2015; MONTOYA et al., 2018; CORDEIRO et al., 2020).

A formação do biofilme compreende etapas comuns a todos os microrganismos, com alterações em pontos específicos, como tempo de adesão e maturação, temperatura ideal de formação e superfície de adesão, estando representada de uma forma esquemática geral na Figura 5 (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013; FLEMMING et al., 2016; de ZHAO et al. 2017; MEHTA et al. 2021).

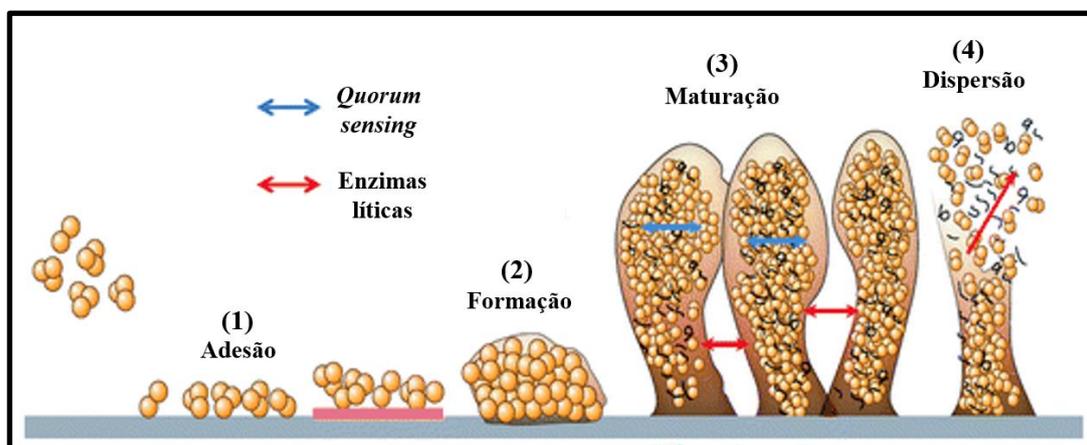


Figura 5. Etapas do desenvolvimento do biofilme. (1) Adesão reversível em superfície biótica ou abiótica; (2) Formação de microcolônias com início da produção da matriz celular exopolimérica; (3) Estabelecimento do biofilme maduro, em que as células estão interligadas pelo *quorum sensing*; (4) Ruptura do biofilme por meio da ação das enzimas líticas, como proteases, com dispersão das células. Fonte: Adaptado de Zhao et al. (2017).

Para a formação do biofilme, é necessário que ocorra a adesão das células a uma superfície biótica, onde há ligações específicas do tipo receptor-ligante, ou em superfície abiótica, mediada por interações físico-químicas não específicas (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013). Existem dois tipos de adesão, a reversível e a irreversível (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013). Na adesão reversível, começa a produção de moléculas sinalizadoras auto-indutoras (sistema *quorum*

sensing) que regulam a formação de biofilme e sinalizam a divisão celular, aumentando sua densidade (KOVÁCS E MAJOROS, 2020).

Posteriormente, ocorre a adesão irreversível, na qual a ação do *quorum sensing* é intensificada, induzindo a transcrição de genes específicos que regulam a produção de fatores de virulência e a síntese da MEP, aumentando a biomassa e conferindo mais robustez ao biofilme (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013). Em seguida, tem-se o biofilme maduro, onde as células estão agregadas e envoltas pela MEP e permeadas por canais de água, que atuam como meio de passagem de nutrientes e de restos metabólicos (TRENTIN, GIORDANI E MACEDO, 2013; FLEMMING et al., 2016). Por fim, as enzimas líticas entram em ação, e as células se destacam da estrutura do biofilme, sendo, então, liberadas para o meio externo (FLEMMING et al., 2016; de ZHAO et al. 2017; MEHTA et al. 2021).

Estudos apontam biofilmes de *Trichosporon* sp. como causadores e potencializadores de IFIs, devido a condições que aliam sua capacidade de adesão em dispositivos médicos intracorpóreos, como catéter venoso central, vesical e peritonial, associado a quadros clínicos de imunossupressão do hospedeiro, o que salienta sua relevância clínica (ALMEIDA et al., 2016; MONTOYA et al., 2018; MEHTA et al. 2021). Além disso, em biofilmes, alguns antifúngicos têm suas CIMs aumentadas em mais de 2.000 vezes em comparação às CIMs das células planctônicas, o que evidencia a dificuldade no tratamento (CORDEIRO et al., 2015; MONTOYA et al., 2018).

2.2.5 Células persistentes

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, as células persistentes representam uma importante estratégia para a evasão do sistema imune do hospedeiro e para a tolerância aos fármacos, já que permanecem dormentes diante de grandes estresses e conseguem sobreviver, reativando, ao cessar a ameaça (LA FLEUR et al., 2006; AL-DHAHERI e DOUGLAS, 2008; POLKE, HUBE, JACOBSEN, 2015; SILVA et al., 2017).

O termo "persistente" foi usado pela primeira vez por Bigger em 1944 para descrever um grupo de células de *Staphylococcus* que tinham a capacidade de sobreviver quando expostas a concentrações de penicilina suficientes para matar as formas normais (BIGGER em 1944). Hoje, sabe-se que essas células estão presentes em diversos microrganismos, incluindo fungos e bactérias: *C. albicans* (LAFLEUR et al., 2006), *C. parapsilosis*, *C. krusei* (AL-DHAHERI & DOUGLAS, 2008), *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (DEFRAINE et al., 2018).

Em biofilmes de *C. albicans*, as células com fenótipo *persistenter* são responsáveis por 0,1 a 3% da população do biofilme e podem permanecer viáveis a concentrações elevadas de agentes antimicrobianos (LA FLEUR et al., 2006). Essas células são geneticamente idênticas às de origem, representando variantes fenotípicas do tipo selvagem, não mutantes, que possuem a habilidade que reduzirem ao máximo o seu metabolismo como uma estratégia de sobrevivência em situações de estresse, como o esgotamento de nutrientes ou exposição a espécies reativas de oxigênio (WUYTS, DIJCK & HOLTAPPELS, 2018; FRAIHA et al., 2019).

Acredita-se que uma das habilidades das células persistentes consiste na capacidade de oxidar os ácidos graxos para compensar as deficiências nutricionais e que por esse motivo possuem menor quantidade de ergosterol ou dispõem de ergosteróis estruturalmente diferentes em suas membranas celulares, devido à falta de seus precursores, em comparação às células em condições normais, o que pode explicar a diminuição da afinidade da AMB pelas células persistentes e o aumento da tolerância (BOJSEN et al., 2016).

O sucesso dessas células no estabelecimento de infecções de difícil tratamento se deve ao fato de sobreviverem em condições extremas, mesmo sendo expostas a altas concentrações de drogas (BOJSEN et al., 2016). Os mecanismos ainda são pouco compreendidos, mas evidências experimentais sugerem que seu baixo metabolismo, permanecendo quiescentes na fase G0 do ciclo celular por longo período, e sua característica de dormência diminui a expressão do alvo do medicamento, resultando em fraca ou nenhuma atividade da droga contra essas células (BOJSEN et al., 2016).

Estudos atuais sugerem que existem outros mecanismos essenciais para a sobrevivência dessas células, incluindo proteção contra espécies reativas de oxigênio - ROS (LI et al., 2015), efluxo de drogas ativas (COHEN, LOBRITZ & COLLINS, 2013) e expressão de proteínas responsáveis pela diversidade fenotípica, estimulação do crescimento, aderência à superfície e controle do ciclo celular (LI et al., 2015). Além disso, após permanecerem dormentes e metabolicamente inativas por um período, podem ser reativadas e destacadas do biofilme, infectando outros sítios (WUYTS, DIJCK & HOLTAPPELS, 2018).

O fenótipo *persistenter* contribui para a patogênese de diversas infecções humanas, requerendo tratamento prolongado (COHEN, LOBRITZ & COLLINS, 2013; BOJSEN et al., 2016). Adicionalmente, pode oferecer um alto risco a pacientes com resposta imunológica comprometida, tendo em vista que a erradicação de infecções é o resultado da combinação do efeito da terapia antifúngica e da resposta imunológica do hospedeiro (BOJSEN et al., 2016; WUYTS, DIJCK & HOLTAPPELS, 2018).

Embora as células persistentes sejam produtos de erros e falhas ao invés de células com mutações para expressar resistência, sabe-se que elas conseguem retardar substancialmente a taxa de cura com em tratamentos com antimicrobianos (BOJSEN et al., 2016; FRAIHA et al., 2019). Adicionalmente, as células persistentes podem estar presentes em células planctônicas e em biofilmes e, quando reativadas, podem causar infecções crônicas e reicidivantes (SILVA et al., 2017; WUYTS, DIJCK & HOLTAPPELS, 2018). Porém, pouco se sabe sobre a existência delas em *Trichosporon* sp., sendo, dessa forma, um importante e promissor alvo de estudo, tendo em vista que elucidando os mecanismos responsáveis por modular as taxas nas quais essas células fenotipicamente resistentes são produzidas e entendendo como elas se comportam, pode-se elaborar procedimentos para melhor tratar infecções com subpopulações persistentes.

2.2.6 Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são um importante mecanismo de sobrevivência utilizado por diversos microrganismos para se protegerem contra agentes antimicrobianos, desempenhando, também, um relevante papel nos processos fisiológicos essenciais à vida (RAMAGE et al., 2012; GABRIELLI et al., 2016). Também se estima que participam no transporte de moléculas do *quorum sensing*, atuando diretamente na comunicação intercelular, expressão gênica, produção de proteínas e na formação de biofilmes (REZAIE et al., 2018).

Além disso, esses transportadores têm sido associados ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, sendo um obstáculo para a cura de infecções bacterianas e fúngicas (BRILHANTE et al., 2019; REZAIE et al., 2018; SIDRIM et al., 2017). As bombas de efluxo podem reduzir a concentração intracelular do fármaco e bloquear seu sítio de ligação na célula microbiana, fazendo com que o microrganismo fique exposto a concentrações subinibitórias, o que, além de prejudicar a efetividade do fármaco, pode estimular o desenvolvimento de outros fatores de resistência, como modificação da estrutura do sítio de ligação da droga, ou inibição enzimática (RAMAGE et al., 2012; REZAIE et al., 2018). Dessa forma, a superexpressão de bombas de efluxo pode causar resistência adquirida de cepas mutantes (REZAIE et al., 2018).

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras e, para o seu funcionamento, realizam transporte ativo, utilizando o ATP produzido pela própria célula do microrganismo, ou também podem atuar como transportadores ativos secundários, utilizando o potencial de membrana para desempenhar suas atividades (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016; REZAIE et al., 2018). Existem seis famílias de bombas de efluxo, porém as duas classes mais importantes e relacionadas com a patogenicidade em fungos são: os transportadores do tipo ATP-binding cassette (ABC) e os do tipo major facilitator superfamily (MFS) (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016).

As bombas da superfamília MFS utilizam o potencial de membrana para conduzir o efluxo e translocar substratos, como as bombas antiporte de H⁺ (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016). Por outro lado, os transportadores ABC são ATPases que utilizam a hidrólise do ATP como fonte de energia para realizar o efluxo do substrato, em que este pode ser um fármaco, bem como íons, lipídios, carboidratos, nucleosídeos, aminoácidos, peptídeos e outras pequenas moléculas essenciais ao metabolismo (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016; WANG et al., 2020).

Para as espécies de *Candida*, a ocorrência de bombas de efluxo e suas implicações na fisiologia e na patogenicidade do fungo estão bem descritas na literatura (COLEMAN & MYLONAKIS, 2009; RAMAGE et al., 2012; BRILHANTE et al., 2018). Neste gênero fúngico, a superexpressão de bombas de efluxo está diretamente relacionada à resistência aos azólicos, mas, também, a outras classes de antifúngicos, os quais podem ser substrato para esses transportadores, gerando resistência cruzada (RAMAGE et al., 2012). As cepas resistentes apresentam, geralmente, expressão aumentada de CDR1 – responsável pela codificação de transportadores ABC – e MDR1 – responsável pela codificação de transportadores MFS (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016).

Pouco se sabe sobre a atuação das bombas de efluxo em *Trichosporon*. Porém, em 2021, um grupo de pesquisadores estudou a ocorrência desses transportadores em *T. asahii* e concluíram que a atividade das bombas de efluxo está relacionada à resistência ao fluconazol para *T. asahii* de forma semelhante às cepas resistentes aos azólicos de espécies de *Candida*, nas quais a mutação do gene *ERG11* e a hiperexpressão dos genes das bombas de efluxo já foram elucidadas (ABBES et al., 2021; PRASAD, RAWAL and SHAH, 2016). Assim, a detecção da existência de bombas de efluxo em *Trichosporon* abre perspectivas para o estudo de moléculas que utilizam esses transportadores como alvo, inibindo-os e, dessa forma, representando uma alternativa no combate à trichosporonose.

2.2.7 Sensibilidade aos antifúngicos

A sensibilidade *in vitro* de fungos de importância médica é avaliada por meio de técnicas de referência padronizadas, em geral, pelos órgãos: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) (ARENDRUP et al., 2014). Por meio dessas técnicas são determinados os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos frente a diversos fungos, de acordo com os pontos de corte estabelecidos, o que auxilia na escolha do tratamento adequado e permite o conhecimento da epidemiologia local e global da resistência fúngica (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015).

Os pontos de corte são estabelecidos de acordo com a revisão crítica de diversos aspectos e podem variar conforme o órgão a que se tem como referência (CLSI ou EUCAST, por exemplo), sendo classificados em quatro maneiras distintas: sensível (o fungo é inibido pelo fármaco na CIM),

sensíveis dose-dependente (quando a sensibilidade é mediada pela concentração da droga), resistentes (a droga não é indicada como tratamento, pois não atinge a ação inibitória esperada) e intermediários (a droga pode ser um tratamento apropriado em condições específicas) (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b; CLSI, 2012).

Os documentos que servem de base para as análises dos pontos de corte são periodicamente revisados e atualizados. Órgãos distintos utilizam diferentes critérios, por exemplo: o CLSI avalia as distribuições da CIM, critérios farmacocinéticos e farmacodinâmicos da droga e a relação entre as CIMs e o desfecho clínico. Por outro lado, o EUCAST considera 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).

A resistência fúngica ocorre, quando, em um teste de sensibilidade *in vitro*, a concentração inibitória mínima (CIM) da droga excede o ponto de corte de sensibilidade daquele microrganismo (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015). Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida, sendo a intrínseca também chamada de primária, a qual ocorre naturalmente em fungos que não tiveram exposição prévia à droga, como no caso da resistência intrínseca de *Trichosporon* às equinocandinas, ou a resistência de *C. krusei* a fluconazol (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015). Em contrapartida, a resistência adquirida (secundária) ocorre em cepas que anteriormente eram sensíveis e, após exposição ao fármaco, expressaram mecanismos de resistência (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Diversos fatores podem influenciar na baixa sensibilidade, *in vitro*, dos fungos aos fármacos antifúngicos, como superexpressão dos alvos farmacológicos, ação de bombas de efluxo e produção de células persistentes, fazendo com que seja necessária uma maior concentração da droga para que haja o efeito terapêutico (JENSEN et al., 2015; ABBES et al., 2021). Outra condição que promove tolerância farmacológica é a associação em biofilmes, pois nestas estruturas há baixa penetração de agentes químicos, devido à barreira formada pela MEP (MONTROYA et al., 2018; MEHTA et al. 2021).

Adicionalmente, o microrganismo pode apresentar sensibilidade ao fármaco em testes *in vitro*, porém, ao ser administrado nos indivíduos infectados, apresentam resistência clínica (XIE et al., 2014). Como explicação para esses eventos, foi estabelecida a “regra 60-90”, que afirma que infecções causadas por isolados sensíveis aos fármacos *in vitro* respondem de forma satisfatória ao tratamento em 90% dos casos, porém isolados resistentes são eliminados em 60% dos casos (REX E PFALLER, 2002).

Na prática clínica, existem poucas opções terapêuticas de antifúngicos, em comparação com os antibióticos disponíveis no mercado (JENSEN et al., 2015). A explicação é baseada na semelhança estrutural entre as células fúngicas e as células dos hospedeiros, havendo poucos alvos de ação em potencial que não sejam compartilhados entre o fungo e a espécie humana, o que leva à ocorrência de diversos efeitos colaterais e usos clínicos restritos (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017). Por isso, muitos fatores devem ser avaliados antes da escolha do fármaco, como: gravidade da infecção, local onde o fungo está instalado, enfermidade de base, estado imunológico do paciente, função renal e hepática, visto que, na maioria dos casos o tratamento com antifúngicos é prolongado (CHANG et al., 2017; PADOVAN et al., 2019).

Atualmente, os antifúngicos utilizados na terapêutica podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação em: inibidores da síntese do ergosterol (azólicos, derivados morfolínicos e alilaminas); compostos que alteram da permeabilidade da membrana celular por ligação ao ergosterol, gerando poros na membrana fúngica (derivados poliênicos); inibidores da síntese da parede celular (equinocandinas, nicamicina); inibição da produção de ácidos nucleicos (flucitosina) e inibição da síntese dos microtúbulos (griseofulvina) (KATHIRAVAN et al., 2012; CAMPOY E ADRIO, 2016). Dentre estas, para o tratamento de IFIs causadas por *Trichosporon* sp., destacam-se: derivados poliênicos e derivados triazólicos (CHANG et al., 2017; PADOVAN et al., 2019).

A Anfotericina B, derivado poliênico mais utilizado na clínica, têm uma estrutura anfifílica, ligando-se à bicamada lipídica e formando um complexo com o ergosterol (CAMPOY e ADRIO, 2017). Esse mecanismo de ação forma poros na membrana celular dos fungos, resultando em rápida lise celular, por difusão passiva de eletrólitos e íons, com liberação do conteúdo citoplasmático e dano oxidativo, justificando sua ação fungicida e seu amplo espectro de ação (CAMPOY e ADRIO, 2017). Além de se ligar ao ergosterol da membrana, a anfotericina B pode ocasionar acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula fúngica, indução da apoptose e morte celular (BELENKY; CAMACHO; COLLINS, 2013).

Os triazólicos, fármacos amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por *Trichosporon* sp., atuam sobre o complexo citocromo P450 dos fungos, 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 (LINO et al., 2018; SINGH et al., 2019). Dessa forma, os triazólicos alteram a biossíntese do ergosterol, afetando a integridade da membrana celular fúngica e acumulando o seu intermediário tóxico (14- α -metilergosta-8,24(28)-dien-6 β , 3 α -diol), além de modificar a síntese de lipídeos e inativar enzimas do processo oxidativo dos fungos. Os derivados triazólicos são, geralmente, fungistáticos contra leveduras e fungicidas contra os fungos filamentosos, além de possuírem maior afinidade com a enzima fúngica do que com

a dos mamíferos, o que confere segurança no tratamento (XIE et al., 2014; JENSEN et al., 2015; CHANG et al., 2017; SINGH et al., 2019).

Por fim, as equinocandinas inibem a síntese de 1,3- β -D-glucano, um polissacarídeo estrutural importante da parede celular fúngica, afetando, assim, a integridade da parede celular, por isso o bloqueio de sua síntese culmina em desequilíbrio osmótico, prejudicando a viabilidade do fungo (XIE et al., 2014). Os principais fármacos dessa classe são: caspofungina, micafungina e anidulafungina e seu espectro antifúngico engloba *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., sendo inativo contra *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp. e *Trichosporon* spp. (DIOMEDI, 2004; ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016).

Estudos recentes relatam falha terapêutica a determinados azólicos, como fluconazol, em casos de tricosporonose invasiva (SINGH et al., 2019; PADOVAN et al., 2019). Além disso, a resistência intrínseca às equinocandinas e elevadas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de anfotericina B limitam o arsenal antifúngico para combater a tricosporonose invasiva (MONTROYA et al., 2018; LI et al., 2020; ARASTEHFAR et al., 2021).

Como agravante, tem-se que a mortalidade de portadores de enfermidade hematológica é em torno de 11%, mesmo fazendo uso de terapia antifúngica (POLVI et al., 2015). Por isso, a crescente tolerância aos antifúngicos e o desenvolvimento de resistência secundária (adquirida) por cepas clínicas de *Trichosporon* sp., associada às poucas opções terapêuticas atuais do mercado, tornam necessárias as pesquisas por novos alvos terapêuticos (FUENTEFRÍA et al., 2017; PADOVAN et al., 2019).

2.3 Prometazina

A prometazina ((*RS*)-*N,N*-dimetil-1-(10*H*-fenotiazina-10-il)propan-2-amina) (Figura 6), é um fármaco anti-histamínico do grupo das fenotiazinas, a qual na prática clínica é utilizado como antiemético, anti-histamínico e sedativo (CANTISANI et al., 2013). Trata-se de um fármaco lipofílico com baixo peso molecular e características lipofílicas, não sendo substrato para a proteína de ligação glicoproteína-p, a qual é responsável pelo efluxo de moléculas pela barreira-hematoencefálica (BAUMANN-BIRKBECK et al., 2014).

É um fármaco aprovado pelo *Food and Drug Administration* e amplamente utilizado para tratar sintomas alérgicos e na prevenção e tratamento de náuseas (CANTISANI et al., 2013; ROQUINI et al., 2019). Segundo sua classificação farmacológica, atua como antagonista do receptor H1 de primeira geração (ROQUINI et al., 2019). Adicionalmente, a prometazina atua sobre canais iônicos dependentes de ligantes, como os receptores purinérgicos (P2) e receptores colinérgicos

(ACh), e canais de íons dependentes de voltagem, como os canais de sódio, cálcio ou potássio (CANTISANI et al., 2013; ROQUINI et al., 2019).

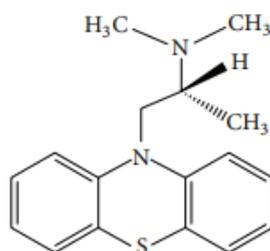


Figura 6. Fórmula estrutural da prometazina. Fonte: Cantisani et al., 2013.

Porém, estudos recentes têm evidenciado sua ação como inibidora de bombas de efluxo, permitindo que essa droga manifeste ação inibitória sobre diversos microrganismos, como fungos e bactérias (BRILHANTE et al., 2018; CORDEIRO et al., 2020; ANEKE et al., 2020). Outro mecanismo também proposto para a prometazina é a inibição da bomba Na⁺/K⁺-ATPase e a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial, desencadeando a apoptose celular (CANTISANI et al., 2013).

Sabe-se que as bombas de efluxo, além de estarem envolvidas da resistência às drogas, tais como os azólicos, são muito importantes em processos metabólicos e celulares dos fungos (RAMAGE et al., 2012; BRILHANTE et al., 2018). Dessa forma, ao inibir as bombas de efluxo, a PMZ pode comprometer uma série de processos celulares, como entrada de cálcio, tolerância ao estresse, transporte de vesículas, atividade enzimática, síntese de cápsulas e aquisição de ferro (COLEMAN & MYLONAKIS, 2009; PRASAD & RAWAL, 2014; PADOVAN et al., 2019).

Além disso, estudos relataram a interação sinérgica *in vitro* entre a prometazina e antifúngicos, potencializando os efeitos destes, o que representa um impacto positivo na busca para debelar infecções fúngicas de difícil tratamento (BRILHANTE et al., 2018; CORDEIRO et al., 2020). Dentre os microrganismos inibidos pela prometazina e relatados na literatura estão: *Burkholderia pseudomallei* (SIDRIM et al., 2017), *Microsporium canis* (ANEKE et al., 2020), *C. tropicalis* (BRILHANTE et al., 2018), complexo de espécies *Fusarium solani* (CORDEIRO et al., 2020) e o complexo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* (BRILHANTE et al., 2020). Adicionalmente, estudos mostram que a prometazina também pode atuar como uma droga antiparasitária e sensibilizadora de biofilme (ROQUINI et al., 2019; DONNERT et al., 2020).

Tendo em vista que as bombas de efluxo podem estar relacionadas à diminuição da sensibilidade das células planctônicas e sésseis de *Trichosporon* aos antifúngicos (ABBES,

SELLAMI e NEJI, 2021), o uso de compostos que interferem no mecanismo de bombas de efluxo, como a prometazina, parece promissor.

3 HIPÓTESES

- ✓ Biofilmes de *Trichosporon* pré-expostos a altas concentrações de anfotericina B são capazes de produzir células persistentes;
- ✓ Células persistentes isoladas de biofilmes de *Trichosporon* têm a habilidade de reativar e produzir novos biofilmes;
- ✓ A prometazina tem efeito inibitório sobre células planctônicas e sésseis de *Trichosporon*;
- ✓ A prometazina melhora a ação de antifúngicos frente a cepas clínicas de *T. asahii* e *T. inkin* e reduz a produção de células persistentes em biofilmes de *Trichosporon*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar a presença e o comportamento de células persistentes em biofilmes de *Trichosporon asahii* e *T. inkin* e o efeito de um inibidor de bombas de efluxo sobre células planctônicas e sésseis de *Trichosporon*.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Analisar a presença de células persistentes em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* expostos à anfotericina B;
- ✓ Investigar a sensibilidade, *in vitro*, de células persistentes isoladas de biofilme de *T. asahii* e *T. inkin* frente à anfotericina B;
- ✓ Avaliar a capacidade de reativação e de formação de novos biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* a partir de células persistentes;
- ✓ Analisar as características morfológicas e ultraestruturais de células persistentes extraídas de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*;
- ✓ Determinar o perfil de sensibilidade de células planctônicas e sésseis de *T. asahii* e *T. inkin* à prometazina e sua interação com drogas antifúngicas frente a cepas de *T. asahii* e *T. inkin* nas formas planctônica e séssil;
- ✓ Investigar o efeito da prometazina sobre a quantificação de carboidratos e proteínas de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, bem como determinar o efeito da prometazina sobre a formação de células persistentes em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de estudo

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

5.2 Microrganismos

Um total de doze isolados clínicos foram estudados, sendo cinco cepas de *T. asahii* (CEMM 05-6-072, urina; CEMM 05-6-073, cateter; CEMM 03-1-072, lesão cutânea; CEMM 80, aspirado traqueal e CEMM 81, sangue) e sete cepas de *T. inkin* (CEMM 01-1-143, lesão cutânea; CEMM 01-1-144, lesão cutânea; CEMM 01-1-145, urina; CEMM 05-6-057, *pedra* branca; CEMM 05-6-074, urina; CEMM 05-6-075, área perigenital; CEMM 03-1-073, unhas). Adicionalmente, a cepa de referência *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. albicans* ATCC 10231 foram utilizadas em diferentes momentos, como cepas controle.

Todas as cepas utilizadas pertencem à Micoteca do CEMM e são conservadas por meio de estoque em solução salina a 4 °C. A identificação das cepas foi baseada na análise de características micromorfológicas das colônias obtidas de microcultivo em Ágar Malte (Himedia®, Brasil), bem como por meio de testes fisiológicos, como o teste da urease (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 organizado em duas etapas distintas, de acordo com a sequência dos procedimentos representados no organograma da Figura 7. Todos os experimentos foram realizados *in vitro*. A primeira etapa constituiu-se da avaliação da habilidade de biofilmes maduros de *Trichosporon* produzirem células persistentes e o estudo da capacidade dessas células reativarem, formando novos biofilmes, bem como suas características ultraestruturais e seu comportamento frente à AMB.

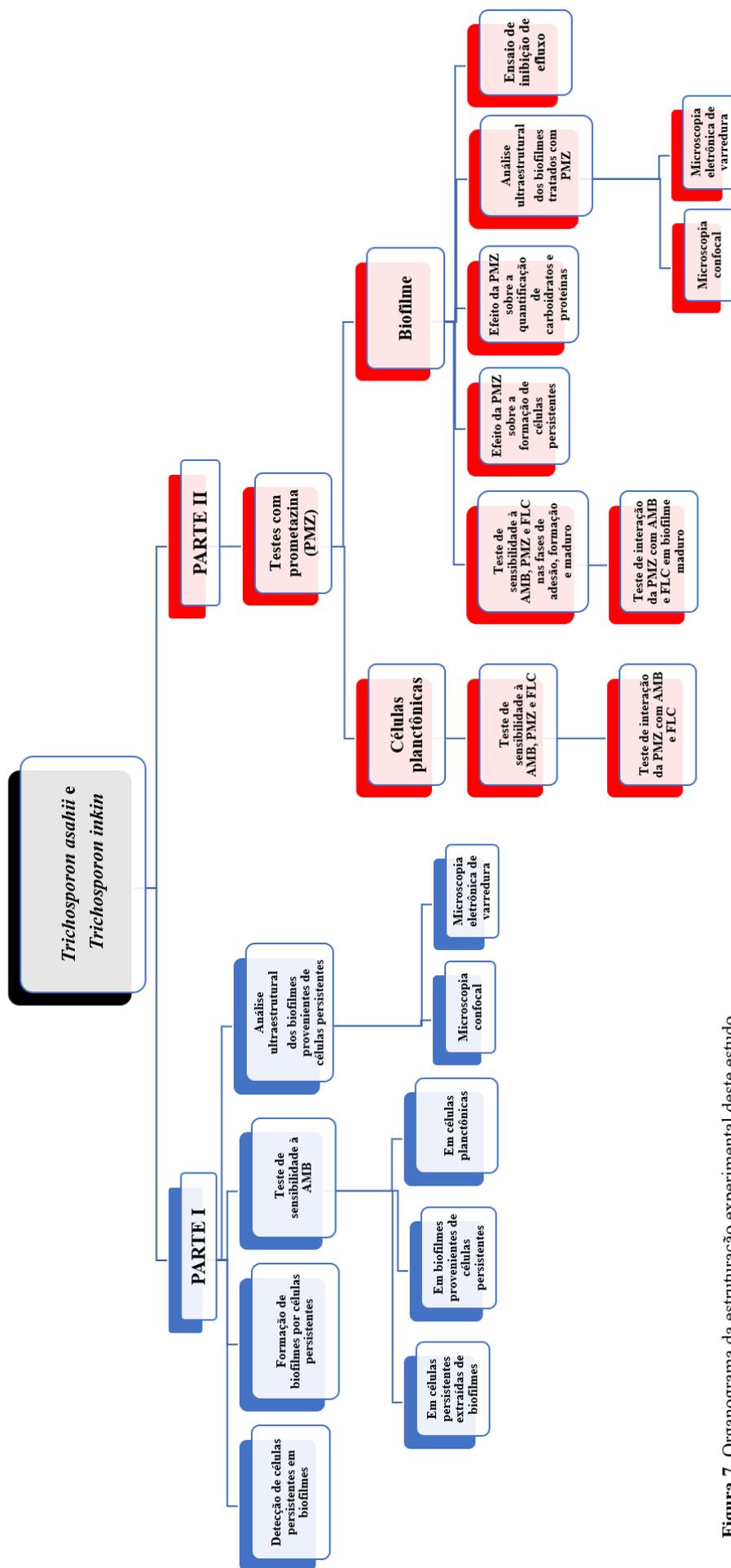


Figura 7. Organograma da estruturação experimental deste estudo.

Na segunda etapa do trabalho, estudou-se o efeito da prometazina sobre células planctônicas e sésseis de *T. asahii* (n= 5) e *T. inkin* (n= 7). Primeiramente, por meio do teste de sensibilidade, avaliou-se o efeito da PMZ, AMB e FLC sobre o crescimento de células planctônicas de *Trichosporon*, a fim de se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dessas drogas para cada cepa utilizada. Também foi testada a ação da PMZ sobre biofilmes de *Trichosporon*, nas fases de adesão, formação e biofilme maduro nas concentrações CIM e 10x CIM planctônico. Tendo-se esses resultados, utilizou-se cepas representativas (boas formadoras de biofilmes) de cada espécie para a análise da interação entre a PMZ e as drogas antifúngicas de uso clínico já citadas, tanto na forma planctônica, quanto em biofilmes maduros. Além disso, foi investigada a ação da PMZ sobre a quantificação de carboidratos e proteínas em biofilmes maduros de *T. asahii* e *T. inkin*, bem como sua ação sobre a produção de células persistentes (por contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro – UFC/ml). Também foi avaliada a influência da PMZ sobre as características ultraestruturais desses biofilmes, por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV e Microscopia Confocal de Varredura a Laser – MCVL, bem como a capacidade de inibir o efluxo.

5.4 Drogas

Soluções-estoque de anfotericina B (AMB; Sigma Chemical Corporation, EUA) e fluconazol (FLC; Pfizer, São Paulo, Brasil) 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 < 5% para garantir a ausência de toxicidade e a não interferência nos efeitos das drogas utilizadas no teste (CLSI, 2012). A solução-estoque do prometazina (PMZ, Sanofi Aventis, SP, Brasil) foi preparada em água destilada estéril. Durante cada experimento, foram feitas diluições seriadas de cada fármaco em RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Corporation, EUA), tamponado a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico 0,165 M (MOPS; Sigma-Aldrich, MO, EUA).

1ª PARTE EXPERIMENTAL

5.5 Ensaio para detecção de células persistentes

Primeiramente, biofilmes maduros foram formados conforme descrito por Cordeiro et al. (2015). As cepas de *T. asahii* (n = 5) e *T. inkin* (n = 7) foram cultivadas em ágar batata dextrose (PDA, Himedia, Mumbai, Índia) a 35 ° C por 48 h. Em seguida, alíquotas de 100 µl de cada suspensão fúngica contendo $2,5 \times 10^6$ cels/ ml foram transferidas para microplacas de 96 poços de fundo chato

contendo 100 µL de RPMI e incubadas a 35 ° C por 6h a 80 rpm, para adesão das células na superfície da placa.

Após a incubação, as células não aderidas foram removidas por lavagem com solução tampão de fosfato estéril acrescido de Tween 20 a 0,05% (PBS-Tween 20, 0,05% v/v) e os poços foram preenchidos com meio RPMI e incubados a 35 ° C por 48h (período de maturação) a 80 rpm. Passado esse período, os poços foram lavados e completados com 200 µl de AMB na concentração 100 µg/ml e incubados a 35 ° C por mais 24h, de acordo com a metodologia descrita por Lafleur et al. (2006) para biofilmes de *C. albicans*.

Em seguida, os poços foram lavados com PBS-Tween 20, raspados com uma ponta de pipeta e as células foram ressuspensas em 100 µl de PBS estéril. Posteriormente, as suspensões foram diluídas em série, semeadas em ágar batata e incubadas a 35 ° C por 24h para contagem de células viáveis. As células que sobreviveram à exposição a 100 µg / ml de AMB foram consideradas células persistentes (LA FLEUR et al., 2006). Todos os testes foram feitos em triplicata, em dois experimentos independentes. Biofilmes formados apenas em meio RPMI 1640 foram incluídos como controle de crescimento de biofilme. *C. albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle para validação da metodologia descrita por La Fleur et al. (2006).

5.6 Ensaio para formação de biofilmes a partir de células persistentes

Tendo-se detectado a presença de células persistentes em biofilmes de *T. asahii* (n = 5) e *T. inkin* (n = 7), decidiu-se investigar a capacidade que essas células possuíam em reativar e formar novos biofilmes. Para isso, aplicou-se a metodologia descrita no item 5.5. Tendo-se isolado as células persistentes, suspensões celulares foram feitas e ajustadas em meio RPMI na escala 0,5 MacFarland. Em seguida, 100 µl de cada suspensão fúngica contendo $2,5 \times 10^6$ cels/ ml foram transferidas para microplacas de 96 poços de fundo chato contendo 100 µL de RPMI e incubadas a 35 ° C por 48h a 80 rpm para formar novos biofilmes, chamados de biofilmes da progênie.

Os resultados foram comparados com os seguintes controles emparelhados: (1) biofilmes maduros produzidos por células planctônicas e (2) biofilmes descendentes produzidos por células destacadas de biofilmes maduros. Em seguida, avaliou-se a atividade metabólica pelo ensaio de redução do 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H- hidróxido de tetrazólio (XTT) (CORDEIRO et al. 2015) e a biomassa pela coloração de cristal violeta (PIERCE et al., 2015).

5.7 Teste de sensibilidade de células persistentes, células sésseis e células planctônicas à AMB

O teste de sensibilidade das células persistentes à AMB foi realizado de acordo com o método de microdiluição em caldo, conforme o documento M27-A3 (CLSI, 2008). Para o isolamento de células persistentes, biofilmes maduros cultivados em meio RPMI sem antifúngicos foram incubados com 100 µg / ml de AMB por 24h, como descrito no item 5.5. Para a formação de biofilmes da progênie, células persistentes foram inoculadas em meio RPMI sem drogas, conforme descrito no item 5.6.

Os resultados foram comparados com os seguintes controles emparelhados: (1) células planctônicas; (2) biofilmes maduros produzidos por células planctônicas; (3) biofilmes descendentes produzidos por células destacadas de biofilmes maduros e (4) biofilmes descendentes produzidos por células persistentes. As células planctônicas foram cultivadas em Ágar Batata Dextrose (Himedia®, Brasil) 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 seguida de 1:20 em 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).

Para testar a sensibilidade das células persistentes e das células extraídas do biofilme da progênie, suspensões celulares de biofilmes foram obtidas após raspagem dos poços e centrifugação a 9.167 xg por 10 min. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril e ajustados para uma concentração final de $0,5-2,5 \times 10^3$ células / ml em meio RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 com 0,165 M MOPS. A AMB foi testada em concentrações que variaram de 0,25 a 128 µg / ml (CORDEIRO et al., 2015). As placas foram incubadas a 35 ° C por 48 h e o crescimento do fungo foi determinado por análise visual.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento visual do fungo. Os isolados foram testados em triplicata, em dois experimentos independentes. Os controles foram cultivados em meio RPMI sem AMB. *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram incluídos como controles de qualidade dos testes.

5.8 Microscopia eletrônica de varredura

A caracterização da estrutura de células persistentes presentes em biofilmes de *T. inkin* (CEMM 05-6-074) e *T. asahii* (CEMM 05-6-072) bem como dos biofilmes produzidos a partir de células persistentes (biofilmes da progênie) 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). Biofilmes maduros foram formados em lâminas Thermanox® em placa de poliestireno de 12 poços.

Os controles pareados foram cultivados em meio RPMI sem antimicrobianos e os poços testes foram tratados com AMB 100 µg / ml, como descrito anteriormente.

Após formados, os biofilmes foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M e incubados durante a noite a 4 ° C. Em seguida, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato 0,15 M por 5 min e desidratados em etanol. As lâminas foram tratadas com hexametildissilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 min para remoção das moléculas de água remanescentes, e então foram revestidas com ouro 10nm (Emitech Q150T, Lewes, Reino Unido) e observadas em MEV (FEI Inspect S50, Thermo Fisher Scientific, Hillsboro, Oregon, EUA) em alta modo de vácuo a 15 kV. O processamento da imagem foi realizado utilizando o software Photoscape v3.6.5 (MooiiTech, Korea).

5.9 Microscopia confocal de varredura a laser

Para avaliar a ultraestrutura das células persistentes presentes em biofilmes de *T. inkin* (CEMM 05-6-074) e *T. asahii* (CEMM 05-6-072) bem como dos biofilmes produzidos a partir de células persistentes (biofilmes da progênie) foi utilizada a Microscopia Confocal de Varredura a Laser - MCVL (DI BONAVENTURA et al., 2006). Biofilmes maduros foram formados em lâminas Thermanox® em placa de poliestireno de 12 poços. Os controles pareados foram cultivados em meio RPMI livre de drogas e os poços testes foram tratados com AMB 100 µg / ml, como descrito nos tópicos anteriores.

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 mensuração do *Z-slice* foi realizada utilizando o software ImageJ 1.50i (COLLINS, 2007).

5.10 Análise estatística

Os dados paramétricos foram avaliados por teste de variância unilateral ANOVA e teste post-hoc de Tukey. O Wilcoxon ou Friedman seguidos pelo teste post-hoc 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).

2ª PARTE EXPERIMENTAL

5.11 Teste de sensibilidade planctônica

Para a avaliação do efeito da PMZ sobre células planctônicas de *Trichosporon* sp., foi aplicado o teste de sensibilidade de acordo com o método de microdiluição em caldo, conforme o documento M27-A3 (CLSI, 2008). Cepas clínicas de *T. asahii* (n = 5) e *T. inkin* (n = 7) 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.

Subsequentemente, a suspensão foi diluída a 1:50 e depois 1:20 com RPMI 1640, para formar um inóculo de células planctônicas contendo $0,5-2,5 \times 10^3$ células/mL. Os testes de sensibilidade foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços (CLSI, 2008). Os antifúngicos AMB e FLC foram utilizados como controles para o teste de sensibilidade à PMZ e nos testes de interação com PMZ. Cada droga foi testada nas seguintes concentrações: 0,0313 – 16 µg/mL para AMB e 0,125 – 64 µg/mL para FLC, conforme as concentrações preconizadas pelo documento citado anteriormente, e 0,5 a 256µg/ml para PMZ, conforme Cordeiro et al., (2020).

As placas foram incubadas a 35 °C e o crescimento fúngico avaliado por leitura visual 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). Em contrapartida, para os azólicos, as CIMs representaram à concentração visualmente mais baixa com 50% de inibição do crescimento (CIM 50), quando comparadas com o controle do crescimento sem fármacos (CLSI, 2008). Para PMZ, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico visível (CIM 100), conforme Brilhante et al., (2018). Os isolados foram testados em triplicata. Os controles foram cultivados em meio RPMI sem antifúngicos. *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram usadas como controle de qualidade dos testes (CLSI, 2008).

Adicionalmente, foi avaliada a interação entre os antifúngicos e a PMZ sobre cepas representativas de *Trichosporon* sp., de acordo com a metodologia de *Checkerboard* (tabuleiro de xadrez) com adaptações (ODDS, 2003; CORDEIRO et al., 2020). Concentrações seriadas de PMZ foram testadas em combinações com FLC (0,0156 a 8 µg / ml) ou AMB (0,0078 a 4 µg / ml). As concentrações inibitórias foram definidas como as menores concentrações de cada fármaco em combinação, capazes de inibir 100% do crescimento fúngico quando comparada com o controle livre de fármaco para AMB/PMZ e $\geq 50\%$ para FLC/PMZ (CORDEIRO et al., 2020). O índice de

concentração inibitória fracionária (ICIF) foi calculado para cada concentração de PMZ combinada com os antifúngicos. O ICIF é 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 a PMZ ($CIM_{a,b}$) 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).

5.12 Testes em biofilmes

5.12.1 Teste de sensibilidade em biofilmes

O efeito da PMZ foi avaliado sobre os biofilmes de *T. asahii* (n = 5) e *T. inkin* (n = 7), nas etapas de adesão, formação e biofilme maduro, conforme Cordeiro et al. (2015) e Cordeiro et al. (2020). Os biofilmes foram formados como descrito por Cordeiro et al. (2015). Para a análise na fase de adesão, as cepas-teste foram previamente cultivadas em ágar batata dextrose a 35 °C por 48h. Em seguida, uma massa celular foi coletada e inoculada em meio RPMI, tendo sua turbidez ajustada na 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 da PMZ 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 tratamento farmacológico. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 6 h, sob agitação de 80 rpm para adesão celular (CORDEIRO et al., 2015). Decorrido esse tempo, 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). A atividade metabólica foi avaliada por redução de Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (KUMAR, NAGARAJAN AND UCHIL, 2018). Nesta fase, a biomassa não foi analisada, devido ao seu valor ínfimo, podendo ser desconsiderado. Todos os testes foram feitos em triplicata em dois experimentos independentes.

Para a investigação da ação da PMZ sobre a etapa de formação dos biofilmes de *T. asahii* (n = 5) e *T. inkin* (n = 7), após o preparo do inóculo conforme descrito acima, 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 para a remoção das células não

aderidas. Posteriormente, alíquotas de 200 μ L da PMZ (CIM e 10xCIM) foram adicionadas aos biofilmes aderidos na placa. Nos poços de controle de crescimento fúngico, foram adicionados apenas 200 μ L RPMI sem droga. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 h, sob agitação de 80 rpm. (CORDEIRO et al., 2015). Decorrido desse tempo, os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween 20 e analisados quanto à viabilidade metabólica (ensaio MTT) e biomassa (coloração de cristal violeta), como descrito anteriormente (KUMAR, NAGARAJAN AND UCHIL, 2018; CORDEIRO et al., 2020). Todos os testes foram feitos em triplicata em dois experimentos independentes.

Analizou-se, também, a PMZ sobre biofilmes maduros. Para tanto, os biofilmes de *T. asahii* (n = 5) e *T. inkin* (n = 7) foram formados como descrito anteriormente e incubados a 35°C por 48h. Decorrido esse tempo, os biofilmes maduros foram lavados duas vezes com PBS-Tween 20, alíquotas de 200 μ L de PMZ (CIM e 10xCIM) foram adicionadas nos poços-testes, 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 MTT para análise da viabilidade metabólica e por coloração de cristal violeta para quantificação da biomassa (KUMAR, NAGARAJAN AND UCHIL, 2018; CORDEIRO et al., 2020). Os testes foram feitos em triplicata em dois experimentos independentes.

5.12.2 Teste de interação da PMZ com antifúngicos em biofilme maduro

Para a avaliação da interação da PMZ com os antifúngicos AMB e FLC, foi empregada uma cepa representativa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma de *T. inkin* (CEMM 05-6-074), conforme Cordeiro et al. (2019b). No procedimento experimental, adicionou-se a PMZ em concentração subinibitória (8 μ g / ml), conforme Cordeiro et al. (2020), a biofilmes maduros de *Trichosporon* (n=02) e incubou-se a 35 °C por 24 h. Em seguida, os sobrenadantes foram aspirados e cada poço foi reabastecido com AMB (10 μ g / ml) ou FLC (40 μ g / ml). As placas foram incubadas por mais 24 h a 35 °C e posteriormente avaliadas quanto à atividade metabólica (pelo ensaio de redução de MTT) e biomassa (por coloração de cristal violeta). Os experimentos foram conduzidos em triplicata em dois testes independentes. Os controles de crescimento foram formados em meio RPMI sem antifúngicos.

5.12.3 Ensaio de formação de células persistentes em biofilmes tratados com PMZ

Na investigação do efeito da PMZ sobre a formação de células persistentes de *Trichosporon*, foi utilizada uma cepa representativa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma de *T. inkin* (CEMM 05-6-074). No teste, biofilmes maduros foram lavados com PBS-Tween 20 estéril, tratados com PMZ (8 ou 16 μ g / ml) e incubados a 35 °C por 24 h. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS-

Tween 20, completados com 200 µl de AMB (100 µg / ml) e incubados a 35 ° C por mais 24 h. Em seguida, os poços foram lavados com PBS-Tween 20, raspados com uma ponta de pipeta e as células foram ressuspensas em 100 µl de PBS estéril. Posteriormente, as suspensões foram diluídas em série, semeadas em ágar batata dextrose e incubadas a 35 ° C por 24 h para contagem de células viáveis, como descrito no item 5.5. Os controles de crescimento do biofilme foram formados em RPMI sem drogas. Os controles de células persistentes foram formados conforme descrito no item 5.5. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes.

5.12.4 Quantificação de carboidratos e proteínas após exposição à PMZ

O efeito da PMZ sobre a quantificação de carboidratos e proteínas em biofilmes de *Trichosporon* foi avaliada em uma cepa representativa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma de *T. inkin* (CEMM 05-6-074). A metodologia empregada para quantificação de carboidratos foi: coloração com 1% de calcofluor-white (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) (CLARK et al., 2018), 0,1% de Vermelho Congo (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) (BAZZINI et al., 2011), e 0,1% de safranina (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) (ANNE-MARIE et al., 2014). Para quantificação de proteínas, aplicou-se a coloração por SYPRO® Ruby (Thermo Fisher Scientific, NY, Estados Unidos) (MOHAMMED et al., 2013).

Os biofilmes maduros foram formados em microplacas conforme descrito anteriormente e, em seguida, tratados com concentração subinibitória de PMZ (8 µg / ml) e incubados a 35 °C por 24 h. Posteriormente, os sobrenadantes foram aspirados e cada poço foi reabastecido com AMB (10 µg / ml) ou FLC (40 µg / ml). As placas foram, então, incubadas por mais 24 h a 35 °C e, posteriormente, lavadas com PBS-Tween 20 e coradas com os corantes citados acima. As leituras de fluorescência a 430 nm / 510 nm e 465 nm / 630 nm foram realizadas no equipamento Cytation 3 (BioTek, VT, Estados Unidos) para coloração com calcofluor-white e SYPRO® Ruby, respectivamente. Para o Vermelho Congo e a safranina, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Celer Biotecnologia S / A, Minas Gerais, Brasil) a 490 e 630 nm, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em duplicata em dois testes independentes. Os controles de crescimento foram formados em meio RPMI sem antifúngicos.

5.12.5 Microscopia eletrônica de varredura

Os biofilmes de *Trichosporon* sp. foram analisados por meio de MEV, de acordo com Cordeiro et al. (2015) e Di Bonaventura et al. (2006), utilizando-se uma cepa representativa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma de *T. inkin* (CEMM 05-6-074), conforme Cordeiro et al. (2019b).

Biofilmes maduros foram preparados como descrito no ítem 5.12.1, porém diretamente na superfície de lâminas Thermanox® em uma placa de poliestireno de 12 poços.

Após o período de incubação com PMZ (MIC e 10xMIC), 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, 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). Os controles de crescimento foram formados em meio RPMI sem adição de droga.

5.12.6 Microscopia confocal de varredura a laser

Os efeitos de diferentes concentrações de PMZ (MIC e 10xMIC) sobre os biofilmes maduros de uma cepa representativa de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e uma de *T. inkin* (CEMM 05-6-074) também foram analisados por MCVL (DI BONAVENTURA et al., 2006). Os biofilmes foram preparados como descrito anteriormente em lâminas Thermanox® em uma placa de poliestireno de 12 poços. Concentrações de PMZ (MIC e 10xMIC) foram adicionadas nos poços contendo o biofilme maduro e, então, 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. As imagens foram analisadas em cinco diferentes campos a partir das imagens tridimensionais do biofilme, e a mensuração do *Z-slice* foi realizada utilizando o software ImageJ 1.50i (COLLINS, 2007). Foram realizados controles para cada cepa em meio livre de PMZ.

5.12.7 Ensaio de inibição de efluxo

O ensaio de inibição de efluxo foi realizado conforme descrito por Nzakizwanayo et al. (2017) com adaptações. As cepas de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 previamente cultivadas em caldo BHI a 35°C por 24h foram transferidas para meio RPMI e incubadas por mais 24h. Após esse tempo, as culturas foram centrifugadas e as suspensões de células foram preparadas em solução salina estéril até atingirem turbidez de 0,5 na escala de McFarland, para depois serem diluídas em meio RPMI, a fim de se obter um inóculo de aproximadamente $0,5-2,5 \times 10^3$ células/ml. Um total de 100 µl de cada suspensão fúngica foi transferido para placas de microdiluição de 96 poços

contendo RPMI suplementado com Brometo de Etídio (EtBr; 10 µg/mL) como substrato de efluxo e níveis sub-CIM de PMZ (0,125xMIC e 0,25xMIC). Os controles foram formados por meio RPMI com EtBr e PMZ; suspensões celulares com substrato EtBr; e suspensões celulares com PMZ mas sem substrato EtBr. As placas foram incubadas no escuro a 37°C com agitação suave por 2 h. A leitura das placas foi realizada no equipamento Cytation™ 3 Biotek. A fluorescência foi medida em excitação de 540 nm e emissão de 600 nm e o acúmulo relativo de EtBr (indicativo de inibição de efluxo) foi calculado como: fluorescência em células tratadas com PMZ - fluorescência em controles de fundo. Os experimentos foram conduzidos em triplicata em dois experimentos independentes.

5.12.8 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

1ª PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Presença de células persistentes em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

A contagem de UFC/ml evidenciou a presença de células viáveis após a exposição à elevada concentração de AMB. Células persistentes foram detectadas após tratamento com 100 µg /ml AMB, com contagem variando de 9 a 25 x 10⁴ UFC /ml para *T. asahii* e de 1 a 29 x 10⁴ UFC / ml para cepas de *T. inkin* - Figura 8 A. Células persistentes representaram 4% das células viáveis para *T. asahii* e 4% para células de *T. inkin* - Figura 8 B. Como controle do teste, biofilme de *Candida albicans* ATCC 10231 tratado com AMB (100 µg / ml) apresentou contagem de 2 x 10⁴ UFC / ml (1,45%) em contraste com o biofilme de *C. albicans* ATCC 10231 sem adição de drogas (138 x 10⁴ CFU / ml - 100%). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas quando comparadas ao controle de crescimento sem drogas (p <0,05).

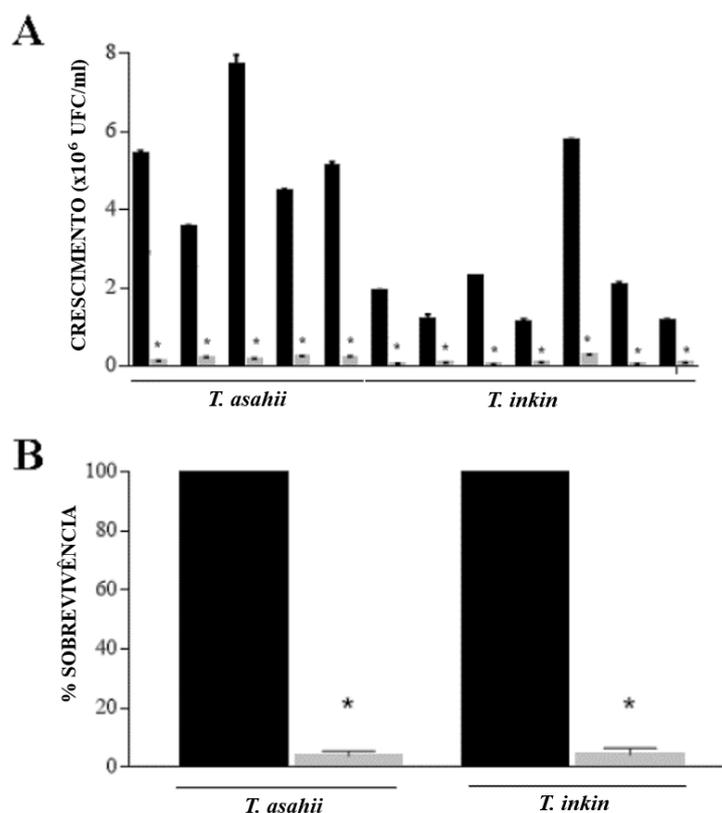


Figura 8. Detecção de células persistentes em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* - barras cinzas. (A) Biofilmes maduros formados em meio RPMI foram tratados com AMB (100 µg / ml). (B) Sobrevivência de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* desafiados com AMB (100 µg / ml). Os controles de biofilme foram cultivados em meio RPMI sem drogas (barras pretas). Os valores são apresentados como média ± DP. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle livre de drogas (P <0,05).

6.2 Células persistentes de *T. asahii* e *T. inkin* podem formar novos biofilmes

Biofilmes maduros de *Trichosporon* sp. tratados com AMB (100 µg / ml) geraram células persistentes capazes de reativar e formar novos biofilmes, denominados biofilmes da progênie (Figura 9). Os resultados foram expressos por mensuração da atividade metabólica (pelo ensaio de redução de XTT) e por quantificação de biomassa (por coloração com cristal violeta). A quantificação da biomassa e da atividade metabólica apresentou diferenças significativas quando comparadas aos controles de crescimento livres de fármacos ($p < 0,05$).

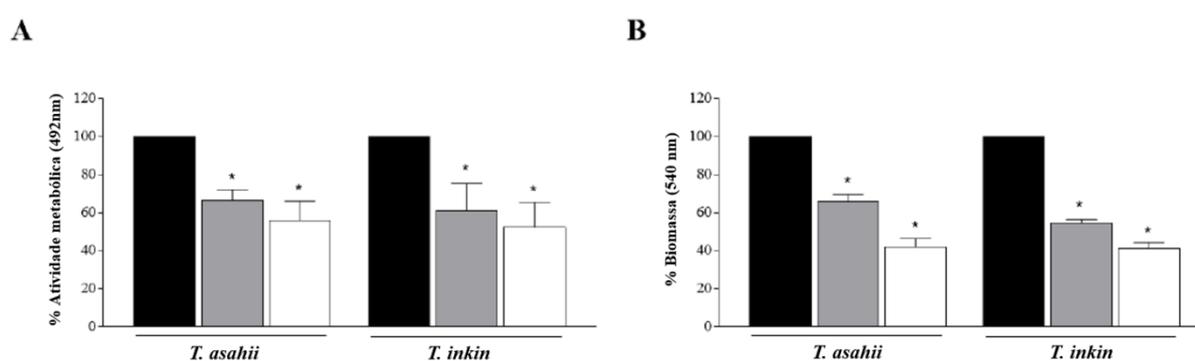


Figura 9. Regeneração de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*. Os biofilmes foram formados em meio RPMI e produzidos por células planctônicas (barras pretas), células destacadas de biofilmes maduros (barras cinza) ou células persistentes (barras brancas). (A) Atividade metabólica expressada como porcentagens relativas de absorvância pelos ensaios de redução de XTT. (B) Biomassa total expressada como porcentagens relativas de absorvância por coloração com cristal violeta. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao controle de crescimento do biofilme produzido pelas células planctônicas ($P < 0,05$).

6.3 Células persistentes de *T. asahii* e *T. inkin* apresentaram tolerância à AMB

O teste de sensibilidade antifúngica evidenciou que células persistentes de *Trichosporon* podem reativar na fase planctônica e apresentam maior tolerância à AMB em comparação às células planctônicas e às células extraídas de biofilmes (semelhante à fase de dispersão) - Tabela 1. As células viáveis extraídas de poços desafiados com AMB 100 µg / ml (células persistentes - **CIM (B) / AMB 100**) de *T. asahii* e *T. inkin* apresentaram as maiores CIMs no teste, variando de 64 a > 128 µg / ml (média geométrica: 111,43 µg / ml e 115,93 µg / ml, respectivamente). As CIMs contra células maduras destacadas do biofilme (**CIM (B)**) variaram de 16 a 64 µg / ml (média geométrica: 36,75 µg / ml para *T. asahii* e 28,98 µg / ml para *T. inkin*). Células persistentes (**CIM (B) / AMB 100**) apresentaram sensibilidade à AMB aumentada, quando comparadas a outras células derivadas de biofilme não tratado (**CIM (B)**). Por fim, as CIMs contra células planctônicas (**CIM**) foram as menores observadas, variando de 0,25 a 2,0 µg / ml para *T. asahii* (média geométrica: 1,41 µg / mL).

e 0,5 µg / mL a 1,0 µg / mL para *T. inkin* (média geométrica: 1,0 µg / mL). A CIM da AMB das cepas de controle *C. krusei* ATCC e *C. parapsilosis* ATCC 22019 estavam em concordância com as diretrizes do CLSI (CLSI, 2008).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima de anfotericina B (AMB) frente a células extraídas de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* produzidos em diferentes condições.

Espécies	Cepas	AMB CIM (µg/ml) *				
		CIM	CIM(B)	CIM (B)''	CIM (B)/ AMB 100	CIM(B)''/ AMB 100
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	0.5	32	16	128	8
	CEMM 05-6-073	1	16	16	64	8
	CEMM 03-1-072	2	32	32	128	8
	CEMM 80	0.25	64	16	>128	2
	CEMM 81	0.5	64	32	>128	4
	Média geométrica	1,41	36,75	21,11	111,43	5
<i>T. inkin</i>	CEMM 01-1-143	0.5	16	08	>128	8
	CEMM 01-1-144	0.5	32	16	128	4
	CEMM 01-1-145	0.5	32	16	128	4
	CEMM 05-6-057	1	32	16	128	8
	CEMM 05-6-074	0.5	16	8	64	2
	CEMM 05-6-075	1	32	16	128	8
	CEMM 03-1-073	1	64	32	128	8
	Média geométrica	1	28,98	14,5	115,93	5

* Inibição 100% do crescimento fúngico visível.

**A CIM da *C. krusei* ATCC 6258 frente à AMB variou de 1 a 2 µg/ml. A CIM da *C. parapsilosis* ATCC 22019 frente à AMB variou de 0,5 a 2 µg/ml.

CIM = concentração inibitória mínima de AMB contra células planctônicas.

CIM (B) = concentração inibitória mínima de AMB contra as células maduras extraídas de biofilmes livres de drogas – células dispersíveis.

CIM (B)'' = concentração inibitória mínima de AMB contra as células extraídas de biofilmes derivados de biofilmes livres de drogas – células de biofilme descendente.

CIM (B) / AMB 100 = concentração inibitória mínima de AMB contra as células extraídas de biofilmes expostas a AMB (100 µg/ml) – células persistentes.

CIM (B)'' / AMB 100 = concentração inibitória mínima de AMB contra as células extraídas de biofilmes derivados de células persistentes que sobreviveram ao tratamento com AMB (100 µg/ml) – células de biofilme da progênie.

6.4 Ultraestrutura dos biofilmes

A morfologia e estrutura de das células persistentes, dos biofilmes da progênie (biofilmes formados a partir de células persistentes) e dos biofilmes descendentes de biofilmes maduros das cepas de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074) foi avaliada através de MEV (Figura 10) e CLSM (Figura 11). Biofilmes controles produzidos em RPMI livre de drogas apresentaram-se estruturados e com alta densidade celular (Figuras 10A, 10B, 11A, 11B). Nos

biofilmes maduros tratados com AMB (100 μg / mL) observou-se a desestruturação da forma tridimensional e a deformação das estruturas fúngicas (Figuras 10C e 10D), com raras células vivas, podendo estas serem representadas pelas células persistentes (Figuras 11C, 11D). As células persistentes foram capazes de formar biofilmes de progênie, porém com menos filamentos e menos matriz extracelular (Figuras 10E, 10F, 11E, 11F) quando comparadas ao controle de crescimento de biofilme livre de droga. Biofilmes descendentes produzidos por células destacadas de biofilmes maduros também mostraram menos filamentos e menos matriz extracelular do que o controle de crescimento sem drogas (Figuras 10G, 10H, 11G, 11H).

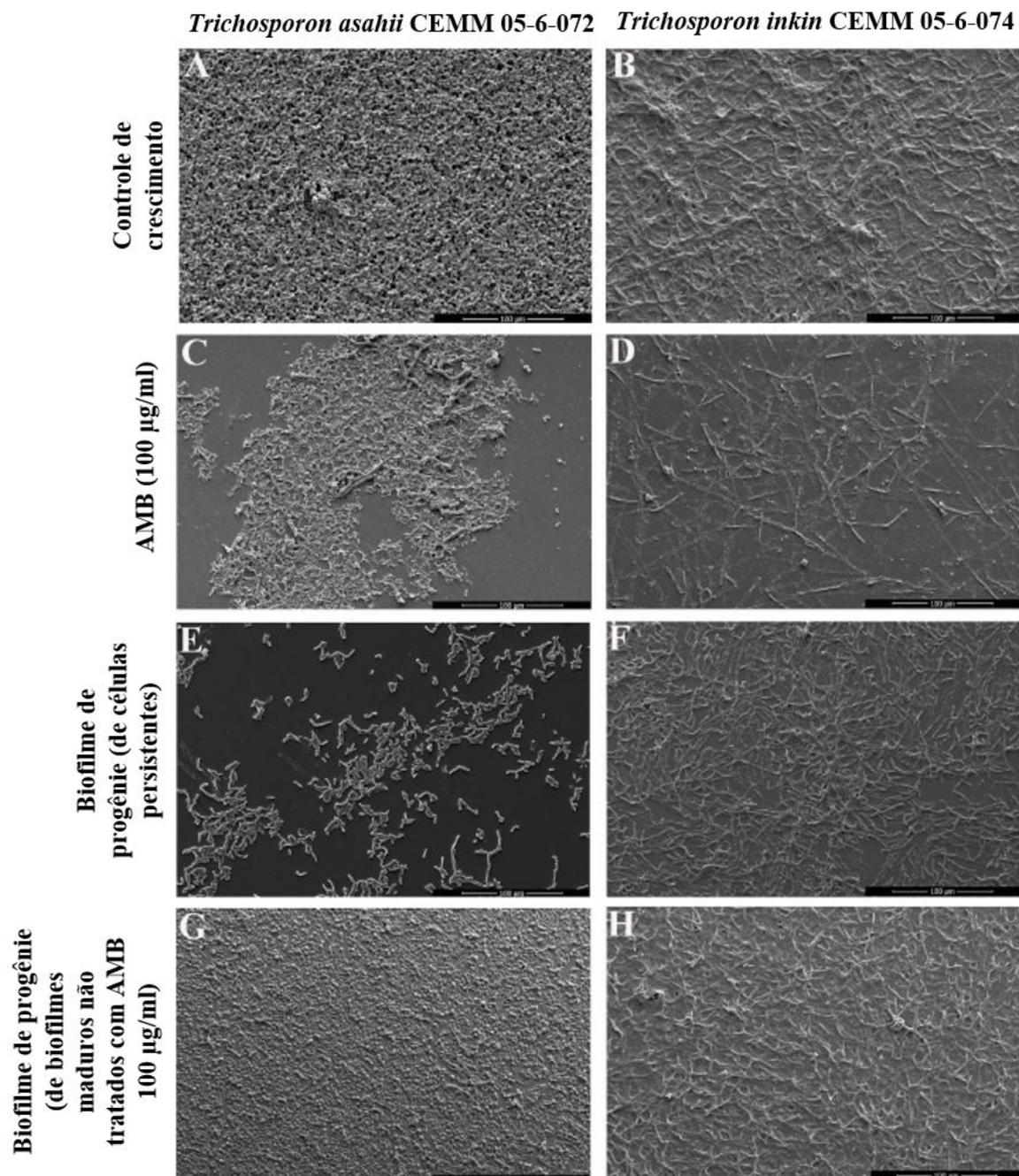


Figura 10. Ultraestrutura de biofilmes maduros de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074) por MEV. (A, B) As células sésseis foram formadas em lâminas de Thermanox™ em meio RPMI sem drogas como controles. (C, D) Biofilmes maduros (48h) foram tratados com 100 µg / ml de AMB e incubados a 35 ° C por 24h, onde as células sobreviventes foram consideradas persistentes. Os biofilmes foram então raspados com uma ponta de pipeta e os inóculos foram preparados em meio RPMI, formando novos biofilmes. (E, F) Biofilmes de progênie produzidos por células persistentes. (G, H) Biofilmes de progênie formado por células destacadas de biofilmes maduros não tratados com drogas. Magnitude: 1000x. Fonte: a autora – CEMM/UFC (2021).

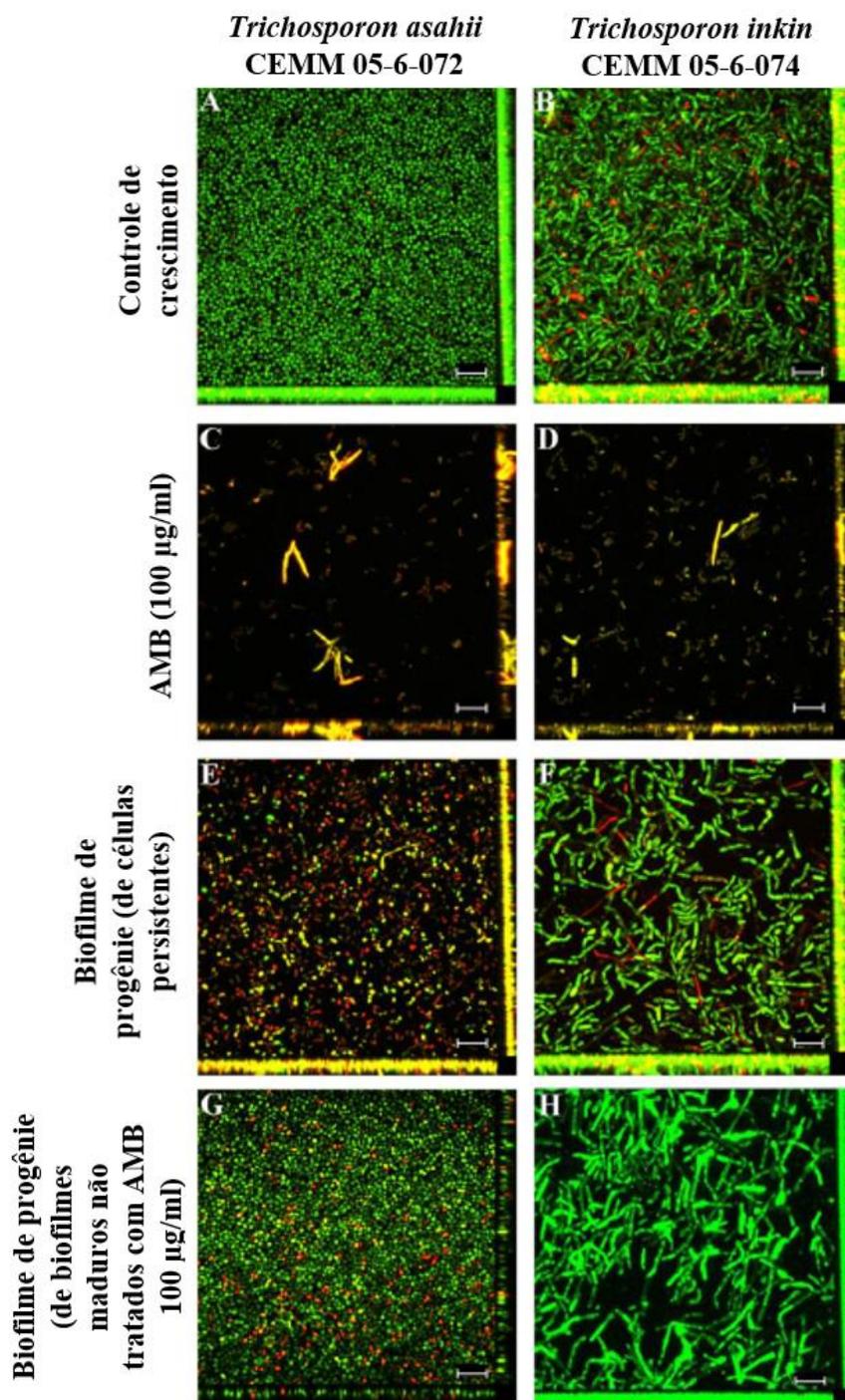


Figura 11. Ultraestrutura de biofilmes maduros de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074) por CLSM. (A, B) As células sésseis foram formadas em lâminas de Thermanox™ em meio RPMI sem drogas como controles – biofilmes maduros. (C, D) Biofilmes maduros (48h) foram tratados com 100 µg / ml de AMB e incubados a 35 ° C por 24h, onde as células sobreviventes foram consideradas persistentes. Os biofilmes foram então raspados com uma ponta de pipeta e os inóculos foram preparados em meio RPMI, formando novos biofilmes. (E, F) Biofilmes de progênie produzidos por células persistentes. (G, H) Biofilmes de progênie formado por células destacadas de biofilmes maduros não tratados com drogas. As células vivas são mostradas em verde e as células mortas / danificadas são mostradas em amarelo / vermelho após a coloração com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente. Ampliação: 400x. Barra: 100 µm. Fonte: a autora – CEMM/UFC (2021).

2ª PARTE EXPERIMENTAL

6.5 Efeito da PMZ sobre o crescimento planctônico de *T. asahii* e *T. inkin*

A sensibilidade das células planctônicas de *T. asahii* (n=5) e *T. inkin* (n=7) à PMZ, AMB e FLC está descrita na Tabela 2. Observou-se que a PMZ inibiu o crescimento planctônico visível das cepas clínicas de *Trichosporon* em 100% com relação ao controle, com as CIMs variando de 32 a 256 µg/ml (Tabela 1). Os resultados da sensibilidade aos antifúngicos dos controles internos estavam em concordância com as diretrizes do CLSI (CLSI, 2008).

Tabela 2. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Trichosporon asahii* e *T. inkin* frente à prometazina (PMZ), anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLC).

ESPÉCIES	CEPAS	PMZ (µg/ml)**	AMB (µg/ml)**	FLC (µg/ml)*
		CIM 100	CIM 100	CIM 50
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	64	0,5	4
	CEMM 05-6-073	128	0,5	2
	CEMM 03-1-072	256	1	2
	CEMM 80	128	0,25	1
	CEMM 81	64	0,5	1
Média geométrica		111,43	1,00	1,74
<i>T. inkin</i>	CEMM 01-1-143	128	0,5	2
	CEMM 01-1-144	128	0,5	1
	CEMM 01-1-145	128	1	2
	CEMM 05-6-057	128	1	2
	CEMM 05-6-074	128	0,25	2
	CEMM 05-6-075	32	0,5	1
	CEMM 03-1-073	128	0,5	2
Média geométrica		105	1	1,64

* 50% inibição do crescimento visível.

** 100% inibição do crescimento visível.

***A CIM da *C. krusei* ATCC 6258 variou de 1 a 2 µg/ml para AMB e de 32 a 64 µg/ml para FLC. A CIM da *C. parapsilosis* ATCC 22019 variou de 0,5 a 2 µg/ml para AMB e de 1 a 2 µg/ml para FLC.

CIM = Concentração Inibitória Mínima.

6.6 Interação da PMZ 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 da PMZ em combinação com AMB e FLC frente a células planctônicas representativas de *T. asahii* (1) e *T. inkin* (1). Os resultados estão descritos na Tabela 3. A PMZ em concentrações subinibitórias reduziu a CIM da AMB em 4x e do FLC em 8x para ambas as cepas testadas, apresentando efeito sinérgico com ambas as drogas, com ICIF < 0,5 (Tabela 3).

Tabela 3. Interação entre a prometazina (PMZ) e os antifúngicos anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLC).

Espécie/cepa	50% inibição			Redução (FLC) (%)	ICIF	100% inibição			Redução (AMB) (%)	ICIF
	PMZ	FLC	PMZ+FLC			PMZ	AMB	PMZ+AMB		
<i>T. asahii</i>										
CEMM 05-6-072	16	4	0.0625 + 0.5	87,5	0.128	64	0.5	0.125 + 0.125	75	0.252
<i>T. inkin</i>										
CEMM 05-6-074	32	2	0.125 + 0.25	87,5	0.128	128	0.25	0.25 + 0.0625	75	0.252

As combinações formadas por PMZ e FLC inibiram o crescimento fúngico em 50%; as combinações formadas por PMZ e AMB inibiram completamente o crescimento fúngico. PMZ foi capaz de reduzir ambas as CIM dos antifúngicos significativamente. Concentrações das drogas expressas em µg / ml. AMB: anfotericina B; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada (sinergismo ICIF ≤0.5; indiferente 0.5<ICIF≤4; antagonismo ICIF>4); FLC: fluconazol e PMZ: prometazina.

6.7 Efeito da PMZ sobre biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

Os resultados obtidos para as cepas de *T. asahii* (5) e *T. inkin* (7) foram representados através das médias das diminuições da atividade metabólica (por redução de MTT) e da biomassa (por coloração com cristal violeta) após exposição dos biofilmes à PMZ, tomando-se como 100% de crescimento o controle com inóculo em RPMI livre de droga.

Durante a fase de adesão, a PMZ causou uma redução na atividade metabólica de 45% (MIC) e 66% (10xMIC) em biofilmes de *Trichosporon*. Em geral, na fase de desenvolvimento, a atividade metabólica foi reduzida em 68% (MIC) e 86% (10xMIC); a biomassa diminuiu 70% (MIC) e 84% (10xMIC). Biofilmes maduros apresentaram diminuição de 56% (CIM) e 86% (CIM 10x) na atividade metabólica, bem como redução de 65% (CIM) e 83% (CIM 10x) na biomassa. Resultados semelhantes para as cepas de cada espécie foram observados. Detalhes sobre cada espécie são mostrados na Figura 12.

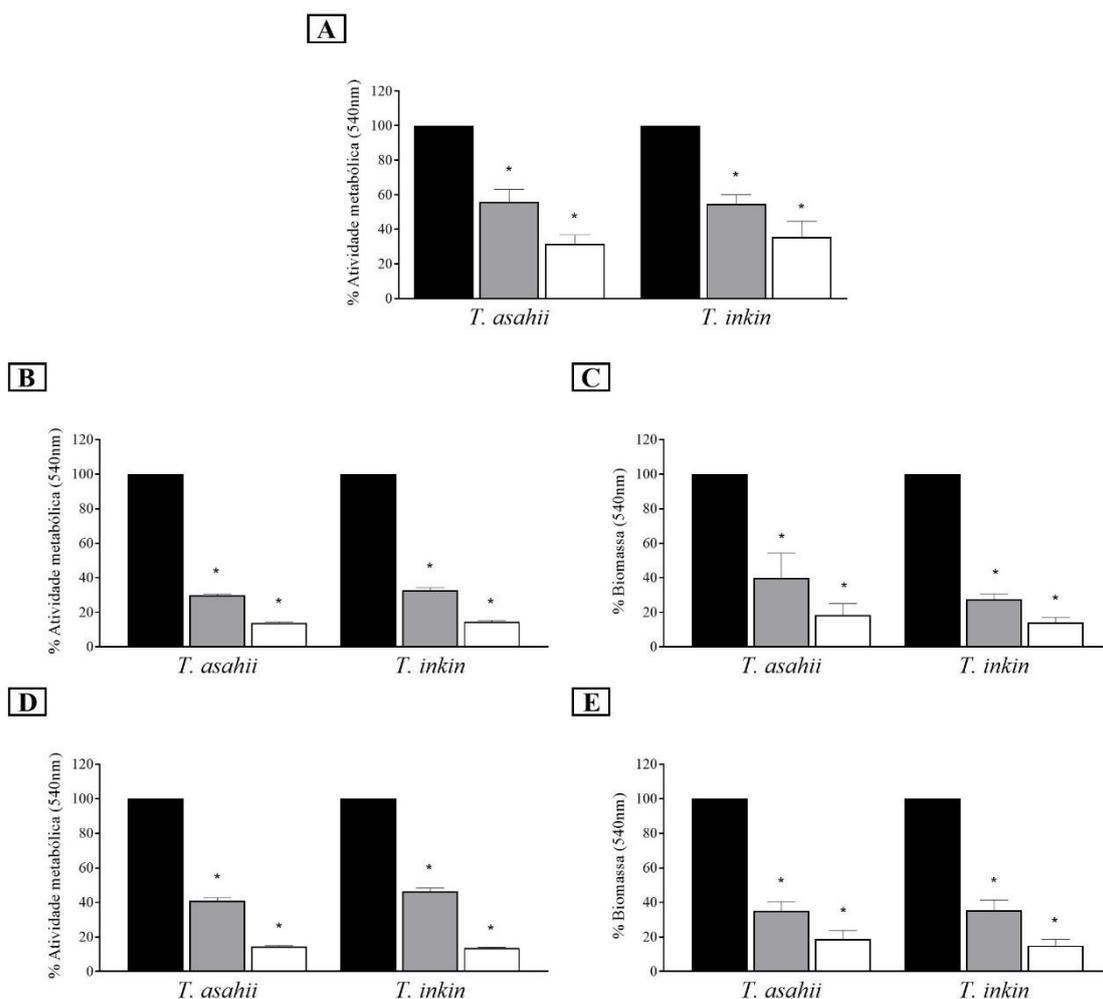


Figura 12. Efeito da PMZ sobre a atividade metabólica e a biomassa de biofilmes de *T. asahii* (n=5) e *T. inkin* (n=7), expressos como porcentagens relativas da absorbância do ensaio de redução de MTT (A, B e D) e coloração com cristal violeta (C e E), respectivamente. (A) Efeito da PMZ na adesão de células de *Trichosporon* durante 6 h. (B e C) Efeito da PMZ no desenvolvimento do biofilme por 48 h. (D e E) Ação da PMZ sobre biofilmes maduros. Barras pretas representam controles de crescimento sem drogas; barras cinza representam biofilmes expostos à PMZ (MIC) e barras brancas representam biofilmes expostos à PMZ (10 × MIC). Os valores são apresentados como média ± erro padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * Diferenças estatisticamente significativas, quando em comparação com controles de crescimento sem drogas (p <0,05).

6.8 Efeito da PMZ sobre a sensibilidade dos biofilmes aos antifúngicos

A pré-exposição dos biofilmes de cepas representativas de *T. asahii* (1) e *T. inkin* (1) a concentração subinibitória de PMZ aumentou, significativamente, a sensibilidade dos biofilmes maduros de *Trichosporon* a FLC e a AMB, conforme mostrado na Figura 13.

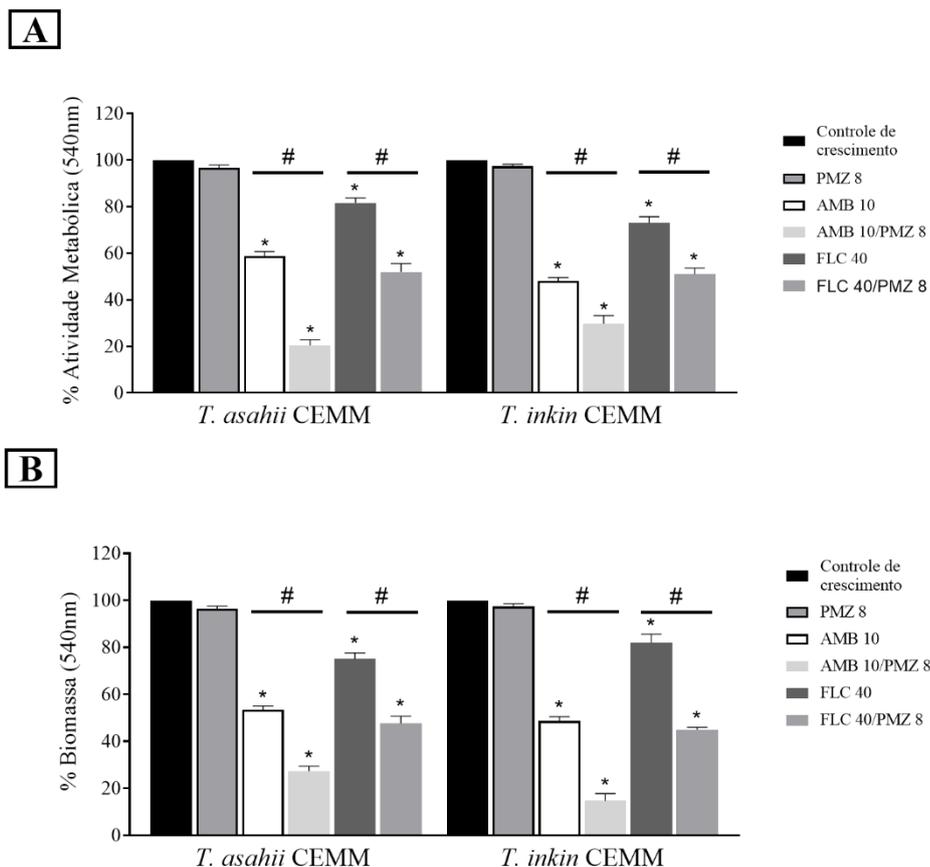


Figura 13. Efeito da PMZ em concentração subinibitória no aumento da sensibilidade de biofilmes maduros de *Trichosporon* frente a FLC (40 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e AMB (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$). A atividade metabólica e a biomassa total foram expressas como porcentagens relativas de absorbância pela redução de MTT (A) e coloração por cristal violeta (B), respectivamente. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas – biofilme maduro; barras cinza com borda preta representa os biofilmes maduros expostos apenas a concentração subinibitória de PMZ (8 $\mu\text{g} / \text{ml}$); barras brancas com bordas pretas representam biofilmes maduros tratados apenas com AMB (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$); barras cinza-claras representam biofilmes maduros pré-exposto à PMZ (8 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e, em seguida, expostos à AMB (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$); barras cinza-escuras representam biofilmes maduros tratados apenas com FLC (40 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e barras cinzas correspondem a biofilmes maduros pré-exposto à PMZ (8 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e, em seguida, expostos à FLC (40 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Os valores foram apresentados como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * 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 PMZ/ATF ($p < 0,05$).

6.9 Ação da PMZ sobre a formação de células persistentes

Na figura 14 A, observa-se a formação de células persistentes em biofilmes maduros de *T. asahii* (1) e *T. inkin* (1) tratados com AMB 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, com ou sem pré-exposição à PMZ (8 $\mu\text{g} / \text{ml}$)

ou 16 $\mu\text{g} / \text{ml}$). A pré-exposição dos biofilmes maduros de *T. asahii* (1) e *T. inkin* (1) a concentrações subinibitórias de PMZ (8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ou 16 $\mu\text{g} / \text{ml}$) reduziu a formação de células persistentes quando comparadas ao biofilme tratado apenas com AMB 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, como exposto na Figura 14 B.

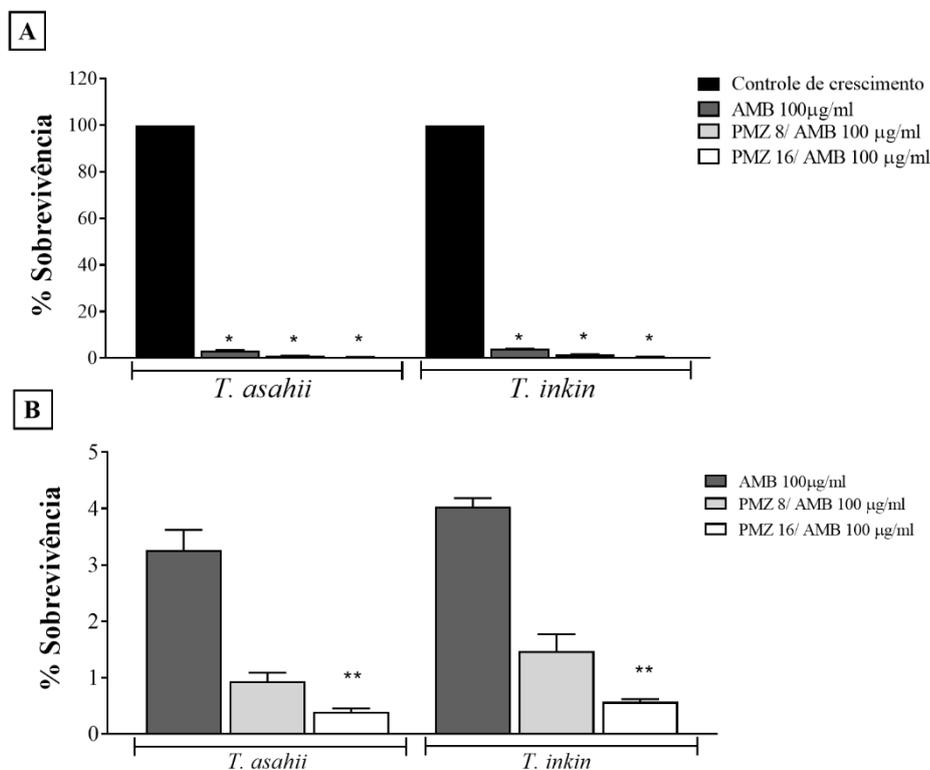


Figura 14. Sobrevivência de células de biofilme maduro de *Trichosporon* pré-exposto a concentrações subinibitórias de PMZ (8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ou 16 $\mu\text{g} / \text{ml}$) por 24h e AMB (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) por adicionais 24h. Os controles de biofilme foram cultivados em meio RPMI sem drogas (barras pretas). (A) As UFC foram expressas como porcentagens de sobrevivência. (B) Os dados do gráfico (A) foram representados em uma outra escala contendo apenas as células persistentes para melhor visualização dos resultados. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle livre de drogas ($P < 0,05$). ** Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle tratado apenas com AMB 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ($P < 0,05$).

6.10 Efeito da PMZ sobre a quantificação de carboidratos de proteínas em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

A PMZ em concentração subinibitória, alterou significativamente a quantificação de carboidratos e proteínas de biofilmes de *Trichosporon*, como mostrado na Figura 15. O biofilmes pré-expostos à PMZ (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e depois expostos aos antifúngicos FLC (40 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e AMB (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) apresentaram uma redução da quantidade de carboidratos em comparação ao controle livre de drogas e aos biofilmes tratados apenas com os antifúngicos FLC (40 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e AMB (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$), como observado na Figura 15 (A, C e D). A quantidade de proteínas se mostrou mais elevada em biofilmes

tratados apenas com FLC (40 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (Figura 15 B). Em contrapartida, biofilmes pré-expostos à PMZ (8 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e depois expostos à FLC (40 $\mu\text{g} / \text{ml}$) apresentaram redução na quantidade de proteínas (Figura 15 B).

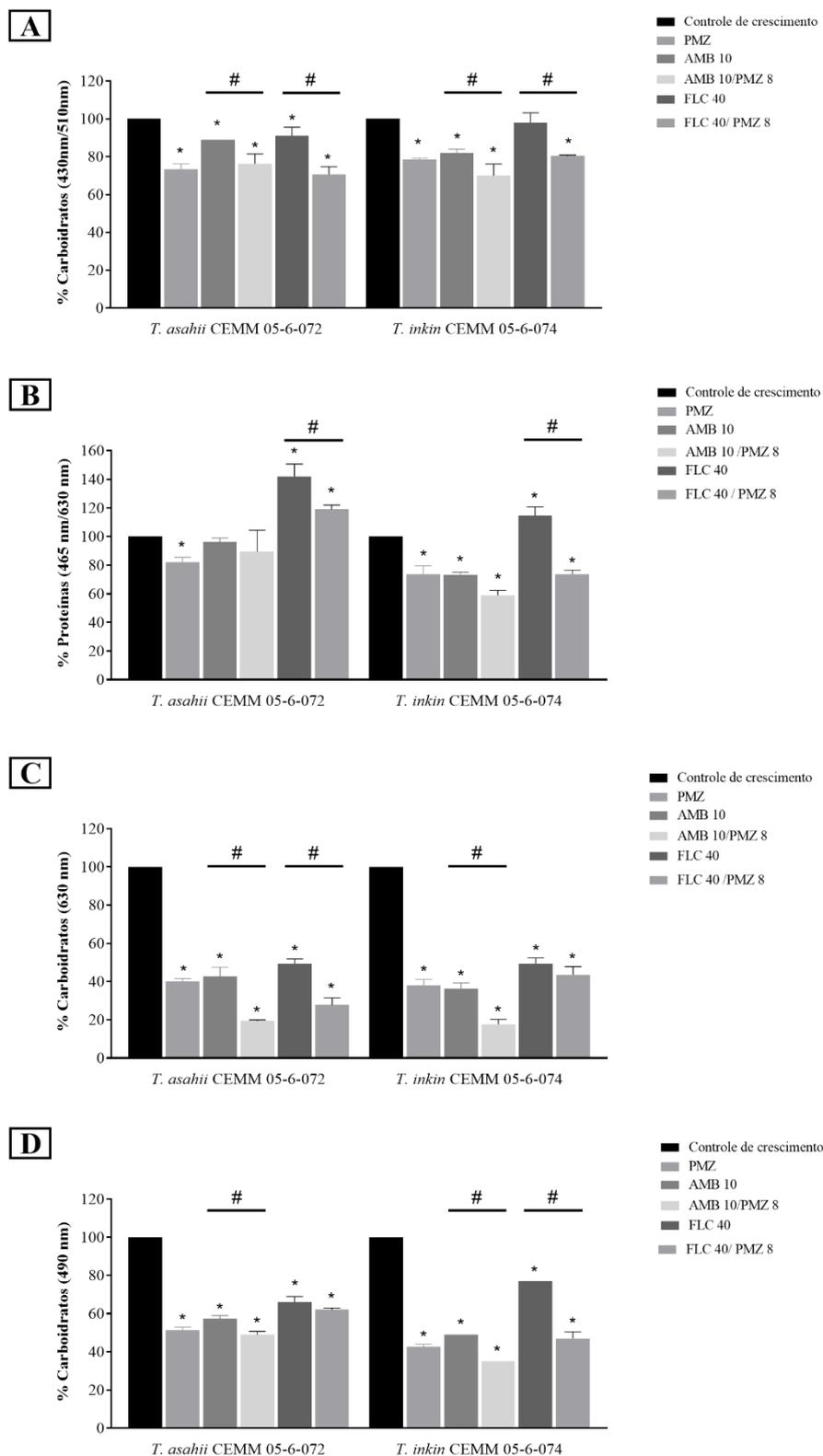


Figura 15. Efeito da PMZ (8 µg /ml) subinibitória e dos antifúngicos FLC (40 µg / ml) e AMB (10 µg / ml) na quantificação de carboidratos e proteínas de biofilmes de *Trichosporon*. Os carboidratos foram expressos como porcentagens relativas de fluorescência (430 nm / 510 nm) por coloração com calcofluor-white (A), porcentagens relativas de absorbância por safranina (630 nm) (C) e coloração com vermelho congo (490 nm) (D). As proteínas foram expressas como porcentagens relativas de fluorescência (465 nm / 630 nm) por coloração com SYPRO® Rubi (B). Os valores são apresentados como média ± erro padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * Diferenças estatisticamente significativas, quando comparadas com controles de crescimento sem drogas (p <0,05). # Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos indicados (p <0,05).

6.11 Efeito da PMZ 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 à PMZ (CIM e 10xCIM planctônica). A análise foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (Figura 16) e microscopia confocal de varredura a laser (Figura 17). Na microscopia eletrônica de varredura, observou-se que os biofilmes de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074) tratados com PMZ (CIM) apresentaram forma desestruturada, com presença de hifas finas, quebradiças e/ou colabadas (Figura 16 C e D). Nos biofilmes tratados PMZ (CIM), observa-se artroconídios colabados (Figura 16 E), hifas finas, quebradiças e/ou colabadas (Figura 16 E e F), evidenciando o dano celular e biofilmes desestruturados.

Na análise por microscopia confocal de varredura a laser, pôde-se observar que os biofilmes de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074) expostos à PMZ (10xMIC) (Figura 17 E e F) apresentaram diversas células mortas (observadas na coloração amarela/vermelha), bem como um biofilme desestruturado (Figura 17 E e F), apresentando espaços vazios, devido à redução da biomassa. Além disso, na análise quantitativa, os gráficos mostraram que a PMZ provocou redução na espessura dos biofilmes (Figura 18A) e aumento da quantidade de células mortas (Figura 18B), comprovando o que foi observado nas imagens.

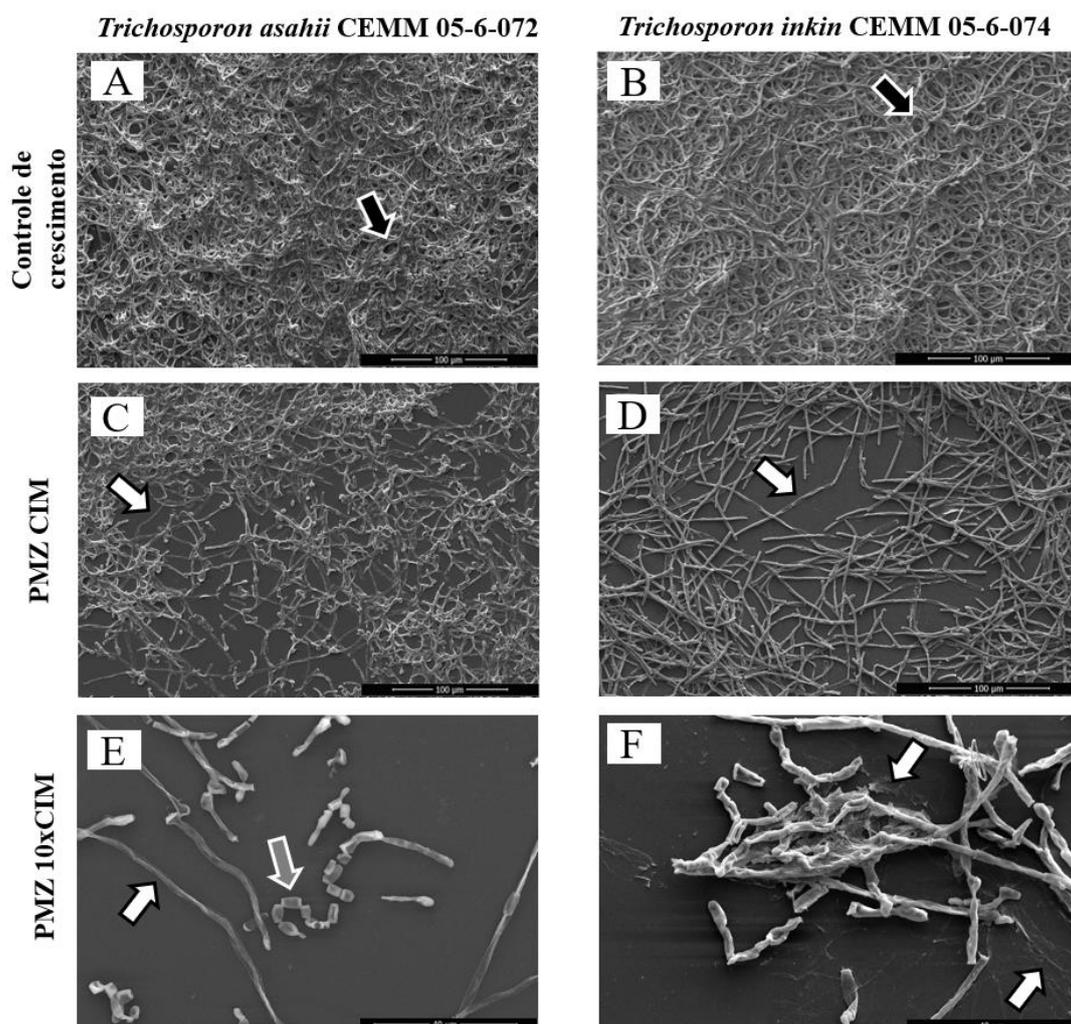


Figura 16. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilme maduro de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074). (A e B) Controle de crescimento do biofilme maduro de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, sem adição de PMZ. (C e D) Biofilme maduro de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, após exposição à CIM planctônica da PMZ, evidenciando comprometimento de sua estrutura. (E e F) Biofilme maduro desestruturado de *T. asahii* and *T. inkin*, respectivamente, após exposição à 10xCIM planctônica da PMZ. Setas pretas com bordas brancas sinalizam os canais de de passagem de água; setas brancas com borda preta indicam hifas finas, quebradiças e colabadas, com estrutura comprometida. Seta cinza com borda branca indica artroconídeos colabados. Magnitude: 1000x (A-D) e 3000x (E-F). Fonte: a autora – CEMM/UFC (2021).

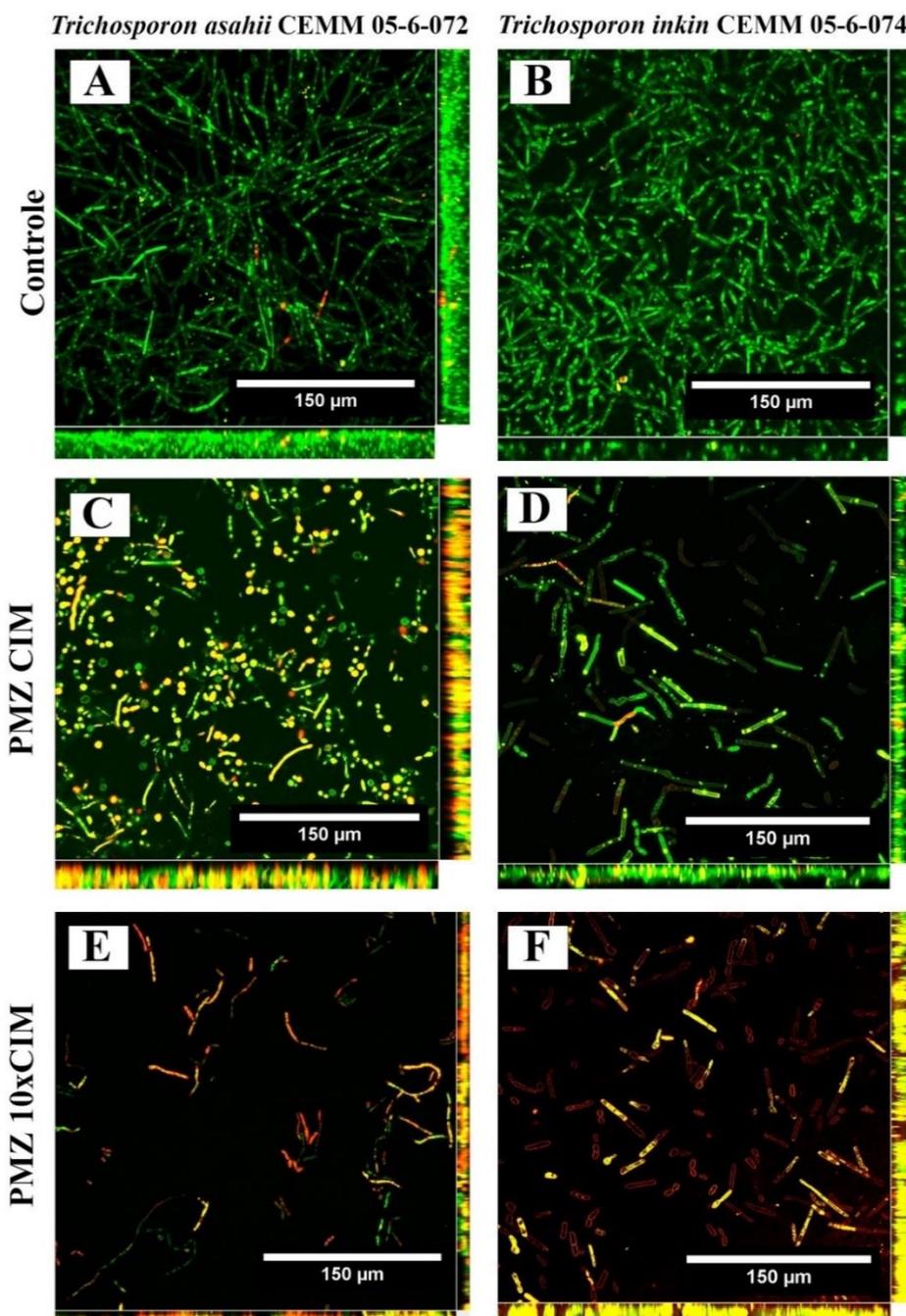


Figura 17. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de *T. asahii* (CEMM 05-6-072) e *T. inkin* (CEMM 05-6-074). (A e B, respectivamente) Controle de crescimento de biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, sem adição de PMZ. (C e D) Biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, após exposição à CIM planctônica da PMZ. (E e F) Biofilme maduro de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente, após exposição à 10x a CIM planctônica da PMZ. As células vivas são mostradas em verde e as células mortas / danificadas são mostradas em amarelo / vermelho após a coloração com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente. Ampliação: 400x. Barra: 150 µm. Fonte: a autora – CEMM/UFC (2022).

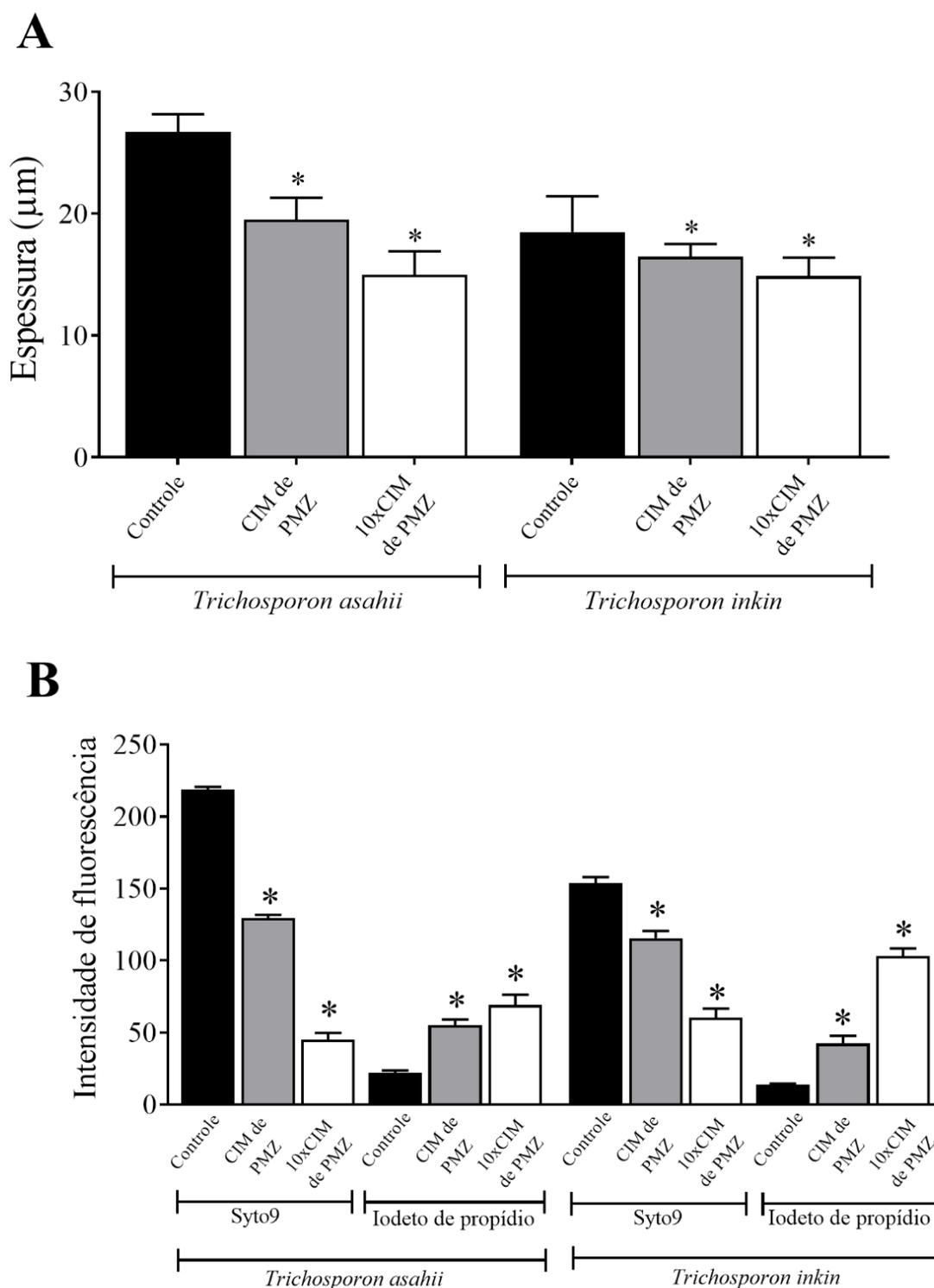


Figura 18. Efeito da PMZ na espessura (a) e na intensidade de fluorescência média (b) de biofilmes maduros de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 analisados por microscopia confocal de varredura a laser. Barras pretas: controles livres de drogas cultivados em meio RPMI; barras cinzas: tratamento com PMZ (MIC plactônico); barras cinza clara: tratamento com PMZ (10xMIC plactônico). O gráfico (b) representa a intensidade colorimétrica de células vivas (verde) e células mortas/danificadas (vermelho) coradas com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente. *Diferenças estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle livre de drogas ($P < 0,05$). Fonte: a autora – CEMM/UFC (2022).

6.12 Efeito da Prometazina sobre o efluxo em *Trichosporon*

Os ensaios de efluxo foram realizados com concentrações subinibitórias de PMZ, com base na CIM avaliada anteriormente. Nas concentrações testadas (0,125xMIC e 0,25xMIC), a PMZ foi capaz de inibir bombas de efluxo em *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074 (Figura 19). Não foi possível detectar um efeito dose-dependente, pois ambas as concentrações de PMZ provocaram um aumento semelhante na fluorescência celular.

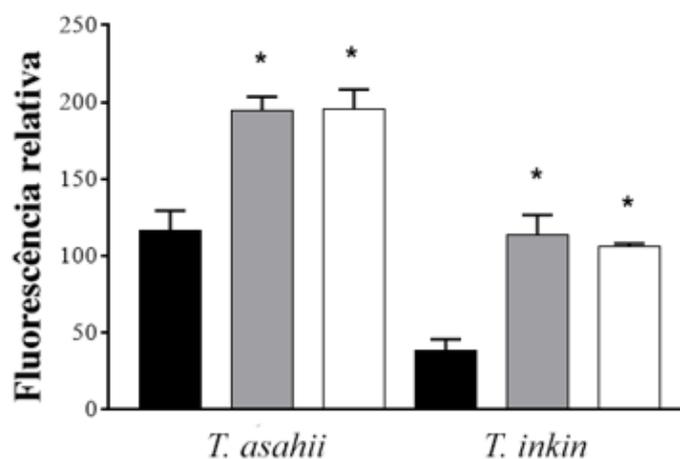


Figura 19. Efeito de PMZ no suposto alvo – bombas de efluxo – em *Trichosporon*. As células foram incubadas em meio RPMI suplementado com PMZ (0,25xMIC, barras cinzas; 0,125xMIC, barras brancas) e EtBr. A intensidade de fluorescência em relação aos controles livres de células (barras pretas) foi medida após 4h de exposição à PMZ. A acumulação de EtBr correlaciona-se com o aumento da fluorescência celular. *Diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos controles de crescimento sem drogas ($p < 0,05$). Fonte: a autora – CEMM/UFC (2022).

7 DISCUSSÃO

Pesquisas recentes têm evidenciado a relevância clínica de fungos do gênero *Trichosporon* e o apontam como um dos principais causadores de IFIs, principalmente em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas, representando o segundo fungo mais prevalente, com alto índice de mortalidade nos pacientes acometidos, sendo ultrapassado apenas pelo gênero *Candida* (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; MEHTA et al., 2021; KOURT & ROILIDES, 2022).

Em 2016, foi publicado um estudo epidemiológico retrospectivo, em que foi relatada a elevação do número de casos de tricosporonose invasiva de 139 (25,8%), entre os anos de 1994 e 2004, para 398 (74,2%), de 2005 a 2015, sendo *T. asahii* e *T. inkin* as principais espécies responsáveis por essas infecções (DE ALMEIDA JÚNIOR e HENNEQUIN, 2016). Ademais, na maioria dos casos, essas espécies possuem elevada virulência e tolerância a antifúngicos, com altos valores de CIM para fluconazol e anfotericina B, o que evidencia a importância do entendimento de seus mecanismos de virulência e a busca de novas alternativas terapêuticas (BASU et al., 2015; FUENTEFRÍA et al., 2017; GUO et al., 2019; PADOVAN et al., 2019).

Sabe-se que a elevada capacidade de se aderir a superfícies, como cateteres, e formar biofilmes permite a fungos do gênero *Trichosporon* o estabelecimento de infecções de difícil tratamento (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; MEHTA et al., 2021). Nesse contexto, no presente trabalho, inicialmente foi avaliada a presença de células persistentes em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, visto que esta característica representaria um potencial fator de virulência para esse gênero fúngico. Posteriormente, com o objetivo de demonstrar a ocorrência de bombas de efluxo em *Trichosporon*, estudou-se a ação da prometazina – um inibidor de bombas de efluxo – sobre biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.

Todas as cepas incluídas neste estudo foram capazes de formar células persistentes a partir de biofilmes maduros de *Trichosporon* expostos à AMB 100 µg/ml, representando uma média de 4% da população de células viáveis para as diferentes espécies analisadas. Também foi realizado um teste controle com *Candida albicans* ATCC 10231, a qual apresentou 1,45% de células persistentes.

Os dados encontrados são similares aos achados de La Fleur e colaboradores (2006), os quais foram os pioneiros a estudar células persistentes em biofilmes fúngicos, mais especificamente em *C. albicans*, e observaram a ocorrência de 1 a 3% de células persistentes em biofilmes expostos a concentrações de AMB de 100 µg/ml até 900 µg/ml. Posteriormente, outros autores demonstraram a existência de células persistentes em biofilmes de diferentes espécies fúngicas: *C. glabrata* (LI et al., 2015), *C. krusei* (AL-DHAHERI E DOUGLAS, 2008), *C. tropicalis* (LI et al., 2015) e *Saccharomyces cerevisiae* (BOJSEN et al., 2014).

Considerando que células persistentes são variantes fenotípicas de células clonais geneticamente idênticas, que permanecem dormentes quando expostas a estresses, como altas concentrações de fármacos (LAFLEUR et al., 2006; WUYTS et al., 2018), decidiu-se investigar a capacidade de reativação de células persistentes de *Trichosporon* e sua habilidade em produzir novos biofilmes. Os resultados mostraram que as células persistentes são capazes de formar novos biofilmes, porém estes são menos robustos e têm menor quantidade de células viáveis, quando comparados ao biofilme de origem. Esses achados foram confirmados através da visualização dos biofilmes descendentes, os quais apresentaram reduzida densidade celular e biomassa em menor quantidade comparados aos biofilmes de origem, em imagens observadas na análise ultraestrutural por MCVL e MEV.

Além disso, estudou-se o comportamento dessas células frente à AMB. Extraíu-se as células de biofilmes maduros não tratados e, também, dos tratados com AMB (100 µg/ml), bem como as células do biofilme da progênie (biofilmes formados a partir de células extraídas de biofilmes tratados com AMB (100 µg/ml) e dos biofilmes livres de drogas) e, então, foi realizado um teste de sensibilidade à AMB, para verificar se as células da progênie apresentariam uma resistência progressiva à AMB, ou se essa resposta diminuiria quando comparada às células de origem.

Nossos resultados mostraram que as células persistentes isoladas de biofilmes de *Trichosporon* apresentaram as maiores CIMs do teste, o que já era esperado, visto que os biofilmes possuem elevada heterogeneidade e plasticidade, o que permite a formação de células fenotipicamente diferenciadas que expressam mecanismos para tolerância a drogas, como a AMB. Também foi observada uma queda acentuada das CIMs das células da progênie quando comparadas às CIMs das células extraídas do biofilme de origem, ou seja, as células extraídas dos biofilmes formados a partir de outro biofilme pré-existente são provavelmente variantes fenotípicas do tipo selvagem, não mutantes, tendo em vista que sua tolerância à AMB diminuiu a cada ciclo.

Estes dados corroboram com os achados de La Fleur e colaboradores (2006) que trataram biofilmes maduros de *C. albicans* com 100 µg/ml de AMB e depois extraíram as células viáveis, formaram novos biofilmes e repetiram esse procedimento por três vezes, obtendo três gerações diferentes de células viáveis. No teste mencionado, os pesquisadores perceberam que as células persistentes não eram mutantes, pois, caso fossem, haveria um aumento progressivo do número de células sobreviventes a cada ciclo de tratamento, porém, o que foi observado foi a capacidade de formar novos biofilmes com uma menor quantidade de células viáveis e metabolicamente ativas (LAFLEUR et al., 2006).

Recentemente, têm-se relacionado as infecções recidivantes à presença de células persistentes (FRAIHA et al., 2019; WUYTS et al., 2018; FISHER, GOLLAN E HELAINE, 2017).

Em 2010, Mulcahy e colaboradores comprovaram a relação direta entre infecções crônicas nas vias aéreas de pacientes com fibrose cística e a presença de células persistentes de *Pseudomonas aeruginosa*. No estudo citado, os pesquisadores observaram que as células provenientes de biofilmes de *P. aeruginosa* apresentavam sensibilidade reduzida a antibióticos e conseguiam driblar a ação do sistema imunológico do hospedeiro (MULCAHY et al., 2010). Além disso, sabe-se que células persistentes estão diretamente relacionadas a infecções causadas por biofilmes aderidos a cateter (FISHER, GOLLAN E HELAINE, 2017) e são fatores agravantes das infecções (FRAIHA et al., 2019).

Sabe-se que a formação de células persistentes é desencadeada pelo esgotamento de nutrientes ou por estresses ambientais (FRAIHA et al., 2019). Conseqüentemente, especula-se que essas células realizem a oxidação de ácidos graxos para compensar as deficiências nutricionais e que por isso possuem menor quantidade de ergosterol ou dispõem de ergosteróis estruturalmente diferentes em suas membranas celulares, devido à falta de seus precursores, em comparação às células em condições normais, o que pode explicar a diminuição da afinidade da AMB pelas células persistentes e o aumento da tolerância (BOJSEN et al., 2016).

Além disso, estudos conduzidos em biofilmes de *C. albicans* mostraram que as células persistentes são capazes de acumular altas quantidades de glicogênio e trealose, moléculas protetoras contra o estresse oxidativo (WUYTS et al., 2018). Adicionalmente, estudos sugerem outros mecanismos essenciais para a sobrevivência dessas células, incluindo a proteção contra espécies reativas de oxigênio - ROS (LI et al., 2015), produção de parede celular espessa (LI et al., 2015; BOJSEN et al., 2016), expressão de proteínas responsáveis pela plasticidade fenotípica (como proteínas do choque térmico – HSP 90), estimulação do crescimento, aderência à superfície e controle do ciclo celular (LI et al., 2015), bem como a expressão de bombas de efluxo (COHEN, LOBRITZ & COLLINS, 2013).

A existência de células persistentes em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* é um importante achado, visto que essas espécies são as principais causadoras de tricosporonose invasiva. As células dormentes podem repovoar o local da infecção e originar infecções crônicas de difícil cura, uma vez que possuem mecanismos que permitem o escape da fagocitose e da ação das drogas antifúngicas, por isso é importante a compreensão do seu funcionamento, bem como a busca por alternativas para combatê-las (COHEN, LOBRITZ & COLLINS, 2013; BOJSEN et al., 2016; WUYTS et al., 2018).

Além de todos os fatores de virulência já citados e discutidos como contribuidores e agravantes da tricosporonose invasiva, recentemente tem-se demonstrado a presença de bombas de efluxo em cepas clínicas de *Trichosporon* (PADOVAN et al., 2019; ABBES et al., 2021). Esse achado

traz novas perspectivas e mecanismos que explicam a tolerância aos antifúngicos, principalmente aos azólicos (PADOVAN et al., 2019; ABBES et al., 2021).

Dessa maneira, na segunda etapa deste trabalho, foi feito o estudo de um inibidor de bombas de efluxo, sobre cepas planctônicas e sésseis, bem como sobre células persistentes de *Trichosporon*. Para isso, utilizou-se a prometazina, droga já empregada na prática clínica por seu efeito antiemético e antialérgico, mas que recentemente vem sendo estudada sobre diferentes microrganismos, apresentando efeitos inibitórios promissores (SIDRIM et al., 2017; BRILHANTE et al., 2018; CORDEIRO et al., 2020).

O teste de sensibilidade planctônico mostrou que a prometazina foi capaz de reduzir em 100% o crescimento *in vitro* de células planctônicas de *Trichosporon* com relação ao controle de crescimento livre de drogas, em concentrações variando de 32 a 256 µg/ml. De maneira semelhante, Brilhante e colaboradores (2018) testaram a prometazina sobre isolados de *C. tropicalis* e demonstraram que a PMZ (64 µg/ml) foi capaz de eliminar 50% das células planctônicas em comparação ao controle não tratado, e a mesma droga na concentração 256 µg/ml eliminou 100% do crescimento fúngico (BRILHANTE et al., 2018).

Na prática clínica, fluconazol e anfotericina B são opções terapêuticas para tratar tricosporonose invasiva (SINGH et al., 2019; ALP et al., 2020). Porém, estudos evidenciam que o uso empírico e isolado dessas drogas está associado à falha terapêutica e a maiores taxas de mortalidade (SINGH et al., 2019; ALP et al., 2020). Entretanto, uma alternativa para tratamentos mais eficazes seria realizar a terapia logo após a obtenção dos resultados dos testes de identificação e de sensibilidade, bem como a associação entre fármacos que tenham efeito sinérgico (SPITZER, ROBBINS E WRIGHT, 2017; ALP et al., 2020).

Para avaliar se a prometazina melhora o desempenho do fluconazol e da anfotericina B frente a isolados de *Trichosporon*, realizou-se o teste de interação com antifúngicos. Como resultado, a prometazina potencializou a ação de todos os fármacos testados sobre as cepas clínicas de *T. asahii* e *T. inkin*. Na fase planctônica, a PMZ, em concentrações subinibitórias, reduziu a CIM de FLC e de AMB frente aos isolados testados em 87,55% e 75%, respectivamente, apresentando sinergismo com ambas as drogas. Estudos prévios têm demonstrado efeitos similares, mesmo em testes com diferentes drogas e outros microrganismos (SIDRIM et al., 2017; BRILHANTE et al., 2018; ANEKE et al., 2020; CORDEIRO et al., 2020).

Brilhante et al. (2018) testou concentrações subinibitórias de prometazina (8 e 16 µg/ml) em combinação com AMB e com azólicos frente a cepas de *C. tropicalis* e observou que a PMZ reduziu as CIMs dos antifúngicos testados em torno de 64 a 128 vezes para fluconazol e voriconazol e de 1.024 a 4.096 vezes para o itraconazol (BRILHANTE et al., 2018). Em adição, a PMZ também

conseguiu reduzir a CIM de anfotericina B e caspofungina de 2 a 16 vezes frente a três isolados de *C. tropicalis* e uma cepa de referência (BRILHANTE et al., 2018).

Em outro estudo, Cordeiro et al. (2020) testou o efeito da prometazina sobre o complexo de espécies *Fusarium solani* e demonstrou que a PMZ reduziu em 100% o crescimento fúngico em concentrações variando de 128 a 256 µg/ml (CORDEIRO et al., 2020). O grupo de pesquisadores também testou concentrações subinibitórias de PMZ combinadas com anfotericina B e com voriconazol frente ao complexo de espécies *Fusarium solani*, obtendo uma melhora do desempenho dos antifúngicos, com redução da CIM em até 98,4% e 99,6% para voriconazol e para anfotericina B, respectivamente (CORDEIRO et al., 2020).

Sabe-se que a grande capacidade que *Trichosporon* tem de se aderir a superfícies e formar biofilmes é um importante fator de virulência e está diretamente relacionado a infecções invasivas, em pacientes que usam cateter venoso central ou outros dispositivos médicos intracorpóreos (MONTROYA et al., 2018; KURAKADO et al., 2021). Por isso, o efeito da prometazina foi avaliado sobre as diferentes fases do biofilme de *Trichosporon* e, em todas as cepas testadas, apresentou significativa atividade antibiofilme, reduzindo sua atividade metabólica e biomassa, tanto na concentração de CIM, quanto na concentração de 10xCIM plactônico.

Resultados semelhantes foram observados por Brilhante et al. (2018) que observaram a ação inibitória da prometazina sobre o biofilme maduro de *C. tropicalis* em concentrações quatro vezes a concentração inibitória para células planctônicas. Outro estudo demonstrou a atividade antibiofilme da PMZ frente a biofilmes de *Cryptococcus* sp. em concentrações de 8 a 64 µg/ml durante a formação de biofilme e de 128 to 1024 µg/ml em biofilmes maduros (BRILHANTE et al., 2020). Por sua vez, em testes performados com *Fusarium solani*, a PMZ reduziu a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes maduros em concentrações variando de 250 a 500 µg/ml (CORDEIRO et al., 2020).

A prometazina ((RS)-N,N-dimetil-1-(10H-fenotiazina-10-il)propan-2-amina) é uma droga lipofílica de baixo peso molecular (GAO et al., 2019). Desse modo, suas características físico-químicas favorecem a penetração do fármaco no biofilme e sua permeabilidade celular (CANTISANI et al., 2013). Uma vez que a prometazina consegue superar as barreiras da membrana, é capaz de inibir a bomba Na⁺/K⁺-ATPase e promover a abertura dos poros de transição da permeabilidade mitocondrial, causando alterações no metabolismo celular e na produção de ATP (CANTISANI et al., 2013). A despolarização e desenergização da mitocôndria tem como consequência o colapso do potencial transmembranar desta organela, o que pode causar a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol da célula, levando à morte celular (ANDRADE-NETO et al., 2014).

Adicionalmente, no presente trabalho, concentrações subinibitórias de PMZ melhoraram o desempenho dos antifúngicos testados sobre os biofilmes de *Trichosporon*. Estudos prévios já têm

demonstrado o impacto positivo da PMZ em combinação com antifúngicos frente a outros patógenos: *Malassezia* spp. (LATTA et al., 2016), *Burkholderia pseudomallei* (SIDRIM et al., 2017), *C. tropicalis* (BRILHANTE et al., 2018), *Cryptococcus neoformans*/ *C. gattii* complex (BRILHANTE et al., 2020), e *F. solani* species complex (CORDEIRO et al., 2020).

Alguns autores sugerem que o mecanismo para o efeito sinérgico entre a PMZ e a AMB se dá pela perda da integridade da membrana celular e dano à função mitocondrial causados pela prometazina, favorecendo a apoptose celular e potencializando o efeito fungicida da anfotericina B (BRILHANTE et al., 2018; PADOVAN et al., 2019). Considerando o sinergismo entre a PMZ e os azólicos, esta pode ser uma forte evidência da existência de bombas de efluxo em *Trichosporon*, porém o dano à membrana mitocondrial também deve ser considerado um mecanismo facilitador, como já demonstrado para *C. tropicalis* (BRILHANTE et al., 2018), uma vez que essa organela tem um papel na produção de energia necessária para diversos processos celulares, incluindo a biossíntese de ergosterol (SUN et al., 2013).

Na análise ultraestrutural, foi observado a ação inibitória da prometazina (nas concentrações de CIM e 10xCIM planctônico) sobre biofilmes maduros de *Trichosporon*, provocando danos e desestruturando biofilmes, com a presença de hifas mais finas, fragmentadas e colapsadas e uma matriz mais escassa quando comparadas ao controle livre de droga, como evidenciaram as imagens obtidas por MEV e MCVL. Além disso, na análise dos biofilmes tratados com PMZ através da coloração Live/Dead, observou-se um aumento da morte celular de biofilmes maduros de *Trichosporon*, o que pode estar relacionado com a ação da prometazina na membrana celular do fungo.

Resultados similares foram observados em um estudo com *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*, no qual concentrações de PMZ de 32 µg/ml (CIM planctônico) provocaram alterações morfológicas e diminuição da quantidade das células do biofilme, e a concentração de 512 µg/ml (16xCIM planctônico) provocou total fragmentação do biofilme (BRILHANTE et al., 2020). Outro grupo de pesquisadores relatou o efeito antibiofilme da PMZ causando disrupção de biofilme maduro de *Fusarium solani* na concentração de 250 µg/ml (CORDEIRO et al., 2020). Os mecanismos mais prováveis de ação da prometazina são apontados como: inibição de bombas de efluxo com interferência em múltiplos mecanismos fisiológicos (PADOVAN et al., 2019), dano mitocondrial (BRILHANTE et al., 2018), dano às membranas celulares e alterações na produção de ATP (BRILHANTE et al., 2018; GALGÓCZY et al., 2011).

Considerando que as células persistentes são um importante fator de virulência e que elas podem estar presentes em biofilmes de *Trichosporon*, como já demonstrado na primeira parte deste trabalho, decidiu-se testar a influência da PMZ sobre a formação de células persistentes em biofilmes

de *T. asahii* e *T. inkin*. Os resultados mostraram que a PMZ reduziu a quantidade de células persistentes formadas nos biofilmes pré-expostos a concentrações subinibitórias, o que é um resultado promissor, visto que essas células estão relacionadas a infecções recidivantes, e novas alternativas terapêuticas são continuamente buscadas para combatê-las (BOJSEN et al., 2016; WUYTS et al., 2018). Além disso, sabe-se que uma estratégia de sobrevivência utilizada por células persistentes é a expressão de bombas de efluxo (COHEN, LOBRITZ & COLLINS, 2013), o que corrobora com um dos principais mecanismos de ação já demonstrados da prometazina, inibindo a expressão de bombas de efluxo em microrganismos, neste caso podendo culminar com a redução das células persistentes.

No ensaio de inibição de efluxo em *Trichosporon*, os resultados obtidos revelaram o acúmulo relativo de EtBr (substrato) no interior do fungo, indicando inibição de efluxo provocada pela ação da PMZ. Padovan e colaboradores (2019) estudaram os mecanismos de resistência de cepas clínicas de *T. asahii* frente aos triazólicos e observaram que a exposição contínua a essas drogas pode induzir mutações no gene *ERG11*, culminando com resistência desses patógenos à referida classe de antifúngicos. No mesmo trabalho, os autores demonstraram a presença da hiperatividade de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Trichosporon* por meio do ensaio de rodamina 6G, utilizando citometria de fluxo, fazendo uma relação direta entre essa característica e a ocorrência de resistência aos azólicos (PADOVAN et al., 2019).

Abbes et al. (2021), por sua vez, demonstraram que a atividade das bombas de efluxo está relacionada à resistência ao fluconazol para *T. asahii* de forma semelhante às cepas resistentes aos azólicos de espécies de *Candida*, nas quais a mutação do gene *ERG11* e a hiperexpressão dos genes das bombas de efluxo já foram elucidadas (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016; BRILHANTE et al., 2018). Brilhante et al. (2018), comprovaram que, dentre os efeitos da PMZ sobre as células de *C. tropicalis*, destaca-se a inibição da atividade de bombas de efluxo do tipo ABC, reduzindo o efluxo dos azólicos e melhorando a sensibilidade do patógeno ao fármaco.

Um estudo anterior avaliou a correlação entre possíveis mutações no gene *ERG11* e o desenvolvimento de resistência a azólicos em isolados clínicos de *T. asahii* obtidos de pacientes com tricosporonemia (KUSHIMA et al., 2017). Os pesquisadores observaram uma mutação pontual diferente (G448A) relacionada a uma única substituição do aminoácido Glicina na posição 150 (G150S), altamente conservado em vários patógenos fúngicos, resultando em resistência aos azólicos, que pode ser induzida pela exposição contínua a esta classe de medicamentos antifúngicos (KUSHIMA et al., 2017).

Li et al. (2017) investigaram como o aumento da exposição ao FLC poderia perturbar o transcriptoma de duas cepas de *T. asahii*. Em seus estudos, os autores demonstraram que alguns genes variaram sua expressão em resposta à exposição contínua a FLC, especialmente o gene A1Q1_07978

que codifica uma carboxipeptidase, família de proteínas que estão associadas à resistência bacteriana a beta-lactâmicos, assim como à vancomicina (Li et al., 2017). Essas proteínas também podem estar associadas à resistência de *T. asahii* a FLC (Li et al., 2017).

Existem duas principais classes de bombas de efluxo bem caracterizadas e relacionadas ao efluxo de azólicos: os transportadores do tipo ATP-binding cassette (ABC) e os do tipo major facilitator superfamily (MFS) (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016). Os transportadores ABC são ATPases que utilizam a hidrólise do ATP como fonte de energia para realizar o efluxo do substrato (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016). Enquanto as bombas da superfamília MFS utilizam o potencial de membrana para conduzir o efluxo e translocar substratos, como as bombas antiporte de H⁺ (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016).

Em geral, essas duas superfamílias de transportadores estão envolvidas na patogenicidade fúngica, incluindo uma série de processos celulares, como entrada de cálcio, tolerância ao estresse, transporte de vesículas, atividade enzimática, síntese de cápsulas e aquisição de ferro (COLEMAN & MYLONAKIS, 2009; PRASAD & RAWAL, 2014; PADOVAN et al., 2019). Esses carreadores também estão diretamente envolvidos no transporte de substratos, incluindo íons, lipídios, carboidratos, nucleosídeos, aminoácidos, peptídeos e outras pequenas moléculas, mostrando grande relevância para a sobrevivência de fungos (WANG et al., 2020). Desse modo, sugere-se que a atuação da PMZ inibindo esses transportadores pode comprometer a integridade dos fungos, não apenas estruturalmente, mas, também, em seus processos metabólicos.

Outros autores sugerem um mecanismo de ação diferente das fenotiazinas através da inibição da ligação do cálcio às proteínas de ligação ao cálcio dos eucariotos (AMARAL et al., 2010; ELÍES et al., 2021). A inibição deste sítio de ligação diminui as enzimas cálcio-dependentes que fornecem energia para as células eucarióticas, com consequente redução das funções da membrana plasmática e diminuição dos transportadores ABC, transportadores de íons cálcio e potássio (AMARAL et al., 2010; ELÍES et al., 2021). Esse mecanismo de ação sobre as funções de membrana dependentes de energia de eucariotos pode ser, também, uma das maneiras propostas para explicar a ação inibitória das fenotiazinas sobre os fungos (AMARAL et al., 2010; ELÍES et al., 2021).

Por fim, na presente pesquisa observou-se que biofilmes pré-expostos à PMZ e depois tratados com baixas concentrações de AMB ou FLC tiveram uma redução substancial de carboidratos e proteínas, provavelmente devido à redução do número de células, ou à redução do metabolismo dessas células, tendo em vista a ação da PMZ sobre os transportadores acoplados à membrana celular, como já previamente descrito por outros autores (COLEMAN & MYLONAKIS, 2009; PRASAD & RAWAL, 2014; PADOVAN et al., 2019). Curiosamente, os poços tratados apenas com fluconazol tiveram uma quantificação de proteínas superior ao controle livre de droga, o que pode estar

relacionado à maior expressão de bombas de efluxo ou proteínas de choque térmico em células submetidas ao estresse farmacológico (LI et al., 2015). Entretanto, nos biofilmes pré-expostos à PMZ e depois tratados com FLC, observou-se uma redução nessa quantificação de proteínas, podendo ser mais um indício da atuação inibitória da PMZ sobre as bombas de efluxo e sobre outras proteínas importantes para a manutenção da vida do referido patógeno.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou, de forma inovadora, que biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* são capazes de formar células persistentes quando expostos a altas concentrações de anfotericina B. Além disso, comprovou-se que essas células persistentes conseguem reativar e formar novos biofilmes, os quais são menos robustos do que os de origem, mas podem ser um caminho para explicar a ocorrência de infecções invasivas crônicas e reincidivantes causadas por esse patógeno.

Com relação aos testes envolvendo a prometazina, os resultados mostraram que o fármaco possui atividade inibitória contra células planctônicas e biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin* e interage de forma sinérgica com drogas antifúngicas, melhorando seu desempenho, *in vitro*, frente a cepas de *T. asahii* e *T. inkin* na forma planctônica e séssil. Adicionalmente, a prometazina altera a quantificação de carboidratos e proteínas de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*, reduz a formação de células persistentes e apresenta atividade antibiofilme, causando alterações na ultraestrutura desses biofilmes.

Considerando que a prometazina é um inibidor de bombas de efluxo, os resultados apresentados são um forte indício da existência desse mecanismo em *Trichosporon*. Finalmente, os dados obtidos neste trabalho trazem novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogenia de *Trichosporon* e aponta a prometazina como uma promissora alternativa no combate e controle de *Trichosporon*.

REFERÊNCIAS

- ABBES, S., SELLAMI, H., NEJI, S., TRABELSI, H., MAKNI, F. AND AYADI, A. Implication of efflux pumps and *ERG11* genes in resistance of clinical *Trichosporon asahii* isolates to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, p. 001236. 2021.
- AGUIAR, Ana Luiza Ribeiro. **Efeito do butirato de sódio sobre células planctônicas e sésseis de *Trichosporon asahii* e *T. inkin***. 2018. 85f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- 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.
- AL-DHAHERI, R.S.; DOUGLAS, L.J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 1884–1887. 2008.
- ALMEIDA JR, J.N.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* Infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1629. 2016.
- 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.
- ALP, S.; GULMEZ, D.; AYAZ, C.M.; ARIKAN-AKDAGLI, S; AKOVA, M. Fungaemia due to rare yeasts in a tertiary care university centre within 18 years. **Mycoses**, v. 63, n. 5, p. 488-493. 2020.
- AMARAL, L.; MARTINS, A.; MOLNAR, J.; KRISTIANSEN, J.E.; MARTINS, M.; VIVEIROS, M.; RODRIGUES, L.; SPENGLER, G.; COUTO, I.; RAMOS, J.; DASTIDAR, S.; FANNING, S.; MCCUSKER, M.; PAGES, J.M. Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDRTB. **In Vivo**, v. 24, n. 4, p. 409-24. 2010.
- ANDES, D.R.; SAFDAR, N.; BADDLEY, J.W, et al; Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Investigators. The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **Transplant Infectious Disease**, v.18, p. 921–31. 2016.
- ANEKE, C.I.; RHIMI, W.; OTRANTO, D.; CAFARCHIA, C. Synergistic Effects of Efflux Pump Modulators on the Azole Antifungal Susceptibility of *Microsporium canis*. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 279-288. 2020.
- ANNE-MARIE, L.; JOHNSON, J.R.; AND DUNNY, G. M. A widely used *in vitro* biofilm assay has questionable clinical significance for enterococcal endocarditis. **PLoS One**, v. 9, p. e107282. 2014.

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.

BAZZINI, S., UDINE, C., SASS, A., PASCA, M. R., LONGO, F., EMILIANI, G., et al. Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*. **PLoS One**, v. 6, p. e18902. 2011.

BAUMANN-BIRKBECK, L.; GRANT, G. D.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; KAVANAGH, J. J. Drowsiness and motor responses to consecutive daily doses of promethazine and loratadine. **Clinical Neurophysiology**, v. 125, n. 12, p. 2390–2396, 2014.

BEIGEL, C. du B. The human hairl London. 1869, citado por FONSECA, O. O gênero *Trichosporon*. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 4, n. 7, p. 251-261,1930.

BIGGER, J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. **The Lancet**, v. 244, n. 6320, p. 497-500. 1944.

BEHREND, G. Ueber *Trichomycosis nodosa* (Juhel-Rénoy): *Piedra* (Osorio). **Berliner KlinischeWochenschrift**, v. 27, p. 464-467, 1890.

BENTUBO, H. D. L.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNAses by different species of *Trichosporon*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 377-387, 2014.

BEURMANN, L.; GOUGEROT, H. AND VAUCHER, H. *Oidiomycose gommeuse*, ulcéreuse, disséminée. Mycose nouvelle, due à un parasite nouveau: l'*Oidiumcutaneum* (ancien groupedesBlastomycoses). **Revue de Médecine**, v. 30, p. 937-958, 1940.

BIEBER, A.K.; POMERANZ, M.K.; KIM, R.H. White *Piedra*. **JAMA Dermatology**, v. 157, n. 3, p. 339. 2021. doi: 10.1001/jamadermatol.2020.4266. PMID: 33471028.

BITTERMAN, MARINELLI E HUSAIN; Strategies for the Prevention of Invasive Fungal Infections after Lung Transplant. **Journal of Fungi**, v.7, n. 2, p. 122, 2021.

BOJSEN, R.; REGENBERG, B.; FOLKESSON, A. *Saccharomyces cerevisiae* biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 305, 2014.

BOJSEN, R.; REGENBERG, B.; FOLKESSON, A. Persistence and drug tolerance in pathogenic yeast. **Current Genetics**, v. 63, n. 1, p. 19-22. 2017.

BRILHANTE, R.S.N.; DE OLIVEIRA, J.S.; DE JESUS EVANGELISTA, A.J.; PEREIRA, V.S.; ALENCAR, L.P.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; CÂMARA, L.M.C.; DE LIMA-NETO, R.G.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Medical Mycology**, v. 56; n. 8, p. 1012-1022. 2018.

BRILHANTE, R.S.N.; GOTAY, W.J.P.; PEREIRA, V.S.; DE OLIVEIRA, J.S.; PEREIRA-NETO, W.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Antifungal activity of promethazine and chlorpromazine against planktonic cells and biofilms of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* complex species. **Medical Mycology**, v. 1; n. 58, p. 906-912. 2020.

CANTISANI, C.; RICCI, S.; GRIECO, T.; PAOLINO, G.; FAINA, V.; SILVESTRI, E.; CALVIERI, S. Topical promethazine side effects: our experience and review of the literature. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 151509, p. 1–9, 2013.

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

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 Infectious Diseases**, v. 39, p. 87-8. 2014.

CLARK, H. L.; MINNS, M. S.; SUN, Y.; DE JESUS, T.; GHANNOUM, M. G.; PEARLMAN, E. Atovaquone impairs growth of *Aspergillus* and *Fusarium* keratitis isolates by modulating mitochondrial function and zinc homeostasis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 59, p. 1589–1598. 2018.

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.

COHEN, N.R.; LOBRITZ, M.A.; COLLINS, J.J. Microbial persistence and the road to drug resistance. **Cell Host Microbe**, v. 13, p. 632-642. 2013.

COLEMAN, J.J.; MYLONAKIS, E. Efflux in fungi: la pièce de résistance. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 6, p. e1000486, 2009.

COLLINS, T.J. **ImageJ for microscopy**. **Biotech**, v. 43, p. 25–30, 2007;

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

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. 2015.

CORDEIRO, R.A.; PEREIRA, L.M.G.; DE SOUSA, J.K.; SERPA, R.; ANDRADE, A.R.C.; PORTELA, F.V.M.; EVANGELISTA, A.J.J.; SALES, J.A.; AGUIAR, A.L.R.; MENDES, P.B.L.; BRILHANTE, R.S.N.; SIDRIM, J.J.D.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; ROCHA, M.F.G. Farnesol inhibits planktonic cells and antifungal-tolerant biofilms of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin*. **Medical Mycology**, v. 57, n. 8, p. 1038-1045. 2019a.

CORDEIRO, R.A.; AGUIAR, A.L.R.; PEREIRA, V.S.; PEREIRA, L.M.G.; PORTELA, F.V.M.; BRILHANTE, R.S.N.; CAMARGO, Z.P.; SIDRIM, J.J.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; ROCHA, M.F.G. Sodium butyrate inhibits planktonic cells and biofilms of *Trichosporon* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p.219-225. 2019b.

CORDEIRO, R.A.; PORTELA, F.V.; PEREIRA, L.M.; DE ANDRADE, A.R.; DE SOUSA, J.K.; AGUIAR, A.L.R.; PERGENTINO, M.L.; DE SALES, G.S.; DE OLIVEIRA, J.S.; MEDRANO, D.J.; BRILHANTE, R.S.; ROCHA, M.F.; CASTELO-BRANCO, D. S.C.M; SIDRIM, J.J. Efflux pump inhibition controls growth and enhances antifungal susceptibility of *Fusarium solani* species complex. **Future Microbiology**, v.15, p.9-20. 2020.

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.; 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 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.

DO ESPÍRITO SANTO, E.P.T.; MONTEIRO, R.C.; DA COSTA, A.R.F.; MARQUES-DA-SILVA, S.H. Molecular Identification, Genotyping, Phenotyping, and Antifungal Susceptibilities of Medically Important *Trichosporon*, *Apiotrichum*, and *Cutaneotrichosporon* Species. **Mycopathologia**, v.185, n.2, p. 307-317. 2020.

DUARTE-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, F.; GONÇALVES, S.M.; GOLDMAN, G.H.; CARVALHO, A.; CUNHA, C. The Cell Biology of the *Trichosporon*-Host Interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 118, 2017.

ELÍES, J.; YÁÑEZ, M.; PEREIRA, T.M.C.; GIL-LONGO, J.; MACDOUGALL, D.A.; CAMPOSTOIMIL, M. An Update to Calcium Binding Proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1131, p. 183-213. 2020.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M.H.; 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. 988-91. 2014.

FISHER, R.A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p.453-464. 2017.

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.

FRAIHA, R.O.; PEREIRA, A.P.R.; BRITO, E.D.C.A.; BORGES, C.L.; PARENTE, A.F.A.; PERDOMO, R.T.; MACEDO, M.L.R.; WEBER, S.S. Stress conditions in the host induce persister cells and influence biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20180001, 2019.

FUENTEFRÍA, 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.

GALGÓCZY, L.; BÁCSI, A.; HOMA, M.; VIRÁGH, M.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C. In vitro antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against different *Candida* species. **Mycoses**, v. 54; p. e737–e743. 2011.

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.

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.; YU, S.Y.; HSUEH, P.R.; AL-HATMI, A.M.S.; MEIS, J.F.; HAGEN, F. et al. Invasive Infections Due to *Trichosporon*: Species Distribution, Genotyping, and Antifungal Susceptibilities

from a Multicenter Study in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 2, p. e01505-18. 2019.

HALLEN-ADAMS, H.E.; SUHR, M.J. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. **Virulence**, v. 8, n. 3, p. 352-358.

HAZIROLAN, G.; KOÇAK, N.; KARAGÖZ, A. Sequence-based identification, genotyping and virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from urine samples of hospitalized patients (2011-2016). **Journal of Medical Mycology**, v. 28, n. 3, p. 452-456. 2018.

INÁCIO, C.P.; ROCHA, A.P.; BARBOSA, R.D.O. N; OLIVEIRA, N.T.; SILVA, J.C.; DE LIMA-NETO, R.G.; MACÊDO, D.P.; NEVES, R.; P. Experimental white *pedra*: a robust approach to ultrastructural analysis, scanning electron microscopy and etiological discoveries. **Experimental Dermatology**, v. 25, n.1, p.79-81. 2016.

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.

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

JENSEN, R.H.; ASTVAD, K.M.; SILVA, L.V.; SANGLARD, D.; JØRGENSEN, R.; NIELSEN, K.F.; MATHIASSEN, E.G.; DOROUDIAN, G.; PERLIN, D.S.; ARENDRUP, M.C. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2551-5. 2015.

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.

KOTWAL, S.; SUMBALI, G.; SHARMA, S.; KAUL, S. Detection of some new *Trichosporon* species from the dystrophied nails of three female members of a family from North Indian State of Jammu and Kashmir. **Mycoses**, v. 61, n. 8, p.534-542. 2018.

KOVÁCS, R.; MAJOROS, L. Fungal Quorum-Sensing Molecules: A Review of Their Antifungal Effect against *Candida* Biofilms. **Journal of fungi (Basel)**, v. 6, n. 3, p. 99. 2020.

KOURTI, M.; ROILIDES, E. Invasive *Trichosporon*osis in Neonates and Pediatric Patients with Malignancies or Hematologic Disorders. **Pathogens**, v.12, n. 11, p. 242. 2022.

KUSHIMA, H., et al., A New Amino Acid Substitution at G150S in Lanosterol 14- alpha Demethylase (*Erg11* protein) in Multi-azole-resistant *Trichosporon asahii*. **Journal of Medical Mycology**, v. 58, p. E23-E28. 2017.

KREGGER-VAN, R.I.J. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Elsevier: Amsterdam, 3^a ed., 1984.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6. 2018.

KURAKADO, S.; MIYASHITA, T.; CHIBA, R.; SATO, C.; MATSUMOTO, Y.; SUGITA, T. Role of arthroconidia in biofilm formation by *Trichosporon asahii*. **Mycoses**, v. 64, n. 1, p. 42-47. 2021.

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

LAGADINOU, M.; ONISOR, M.O.; RIGAS, A.; MUSETESCU, D.V.; GKENTZI, D.; ASSIMAKOPOULOS, S.F.; PANOS, G.; MARANGOS, M. Antimicrobial Properties on Non-Antibiotic Drugs in the Era of Increased Bacterial Resistance. **Antibiotics (Basel)**, v.9, n. 3, p.107. 2020.

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 1995 to 2014. **Forum Infectious Diseases**, v.2, n.4, p.141. 2015.

LINO, C.I.; GONÇALVES DE SOUZA, I.; BORELLI, B.M.; SILVÉRIO MATOS, T.T.; SANTOS TEIXEIRA, I.N.; RAMOS, J.P.; MARIA DE SOUZA FAGUNDES, E.; DE OLIVEIRA FERNANDES, P.; MALTAROLLO, V.G.; JOHANN, S.; DE OLIVEIRA, R.B. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 151, p. 248-260. 2018.

LI, P.; SENEVIRATNE, C.J.; ALPI, E.; VIZCAINO, J.A.; JIN, L. Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of *Candida albicans* biofilm persisters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 6101– 6112. 2015.

LI, H.; WANG, C.; CHEN, Y.; ZHANG, S.; YANG, R. Integrated transcriptomic analysis of *Trichosporon asahii* uncovers the core genes and pathways of fluconazole resistance. **Scientific Reports.**, v. 7, n. 1, p. 17847. 2017.

LI, H.; GUO, M.; WANG, C.; LI, Y.; FERNANDEZ, A.M.; FERRARO, T.N.; YANG, R.; CHEN, Y. Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past 23 years. **Epidemiology & Infection**, v. 148, p. e169. 2020.

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

MAGALHÃES, Alba Regina de. **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE TRICHOSPORON spp. NO RIO DE JANEIRO**. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.

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: isthere a pathogenic role? **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 2, p. 173-179, 2016.

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.

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.

MEHTA, V.; NAYYAR, C.; GULATI, N.; SINGLA, N.; RAI, S.; CHANDAR, J. A Comprehensive Review of *Trichosporon* spp.: An Invasive and Emerging Fungus. **Cureus**, v. 13, n. 8, p. e17345. 2021.

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.

MOHAMMED, M. M. A.; NERLAND, A. H.; AL-HARONI, M.; AND BAKKEN, V. Characterization of extracellular polymeric matrix, and treatment of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms with DNase I and proteinase K. **Journal of Oral Microbiology**, v. 5, p.20015. 2013.

MULCAHY, L.R.; BURNS, J.L.; LORY, S.; LEWIS, K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. **Journal of Bacteriology**, v.192, n. 23, p. 6191-9. 2010.

NZAKIZWANAYO, J.; SCAVONE, P.; JAMSHIDI, S.; HAWTHORNE, J.A.; PELLING, H.; DEDI, C.; SALVAGE, J.P.; HIND, C.K.; GUPPY, F.M.; BARNES, L.M.; PATEL, B.A.; RAHMAN, K.M.; SUTTON, M.J.; JONES, B.V. Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. **Scientific Reports.**, v. 7; n. 1, p. 12222. 2017.

NOGUCHI, H.; MATSUMOTO, T.; KIMURA, U.; HIRUMA, M.; KANO, R.; YAGUCHI, T.; FUKUSHIMA, S.; IHN, H. Onychomycosis caused by *Trichosporon cacaoliposimilis*. **The Journal of Dermatology**, v. 47, n.5, p. e193-e195. 2020.

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

ONISHI, Y.; KAWAMURA, T.; HIGASHINO, T.; KAGAMI, R.; HIRATA, N.; MIYAKE, K. Clinical features of chronic summer-type hypersensitivity pneumonitis and proposition of diagnostic criteria. **Respiratory Investigation**, v. 58, n. 1, p. 59-67. 2020.

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

PADOVAN, A.C.B.; ROCHA, W.P.D.S.; TOTI, A.C.M.; FREITAS DE JESUS, D.F.; CHAVES, G.M.; COLOMBO, A.L. Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: Triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 133, p. 103267. 2019.

PAPON, N.; BOUGNOUX, M.E.; D'ENFERT, C. Tracing the Origin of Invasive Fungal Infections. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 240-242. 2020.

PIERCE, C.G.; CHATURVEDI, A.K.; LAZZELL, A.L.; POWELL, A.T.; SAVILLE, S.P.; MCHARDY, S.F.; LOPEZ-RIBOT, J.L. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 1, p.15012. 2015.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I.D. *Candida* survival strategies. **Advances in Applied Microbiology**, v. 91, p. 139-235. 2015.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Frontiers in Pharmacology**, v.5, n. 202, p. 1-13, 2014.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K.; SHAH, A. H. *Candida* efflux ATPases and antiporters in clinical drug resistance. In: Yeast Membrane Transport. [s.l.] **Springer**, 2016.

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

REICHHARDT, C; STEVENS, D.A.; CEGELSKI, L. Fungal biofilm composition and opportunities in drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v.8, n. 12, p.1455-68. 2016.

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.

REZAIE, P.; POURHAJIBAGHER, M.; CHINIFORUSH, N.; HOSSEINI, N.; BAHADOR, A. The Effect of *Quorum-Sensing* and Efflux Pumps Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Against Photooxidative Stress. **Lasers in Medical Science**, v. 9, n. 3, p.161-167. 2018.

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.

ROQUINI, D.B., COGO, R.M., MENGARDA, A.C., MAZLOUM, S.F., MORAIS, C.S., XAVIER, R.P., SALVADORI, M.C., TEIXEIRA, F.S., FERREIRA, L.E., PINTO, P.L., MORAIS, T.R. AND DE MORAES, J. Promethazine exhibits antiparasitic properties *in vitro* and reduces worm burden, egg production, hepatomegaly, and splenomegaly in a schistosomiasis animal model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n 12, p. e01208-19. 2019.

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 Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p. e11-7.

RUHNKE, M.; BEHRE, G.; BUCHHEIDT, D.; CHRISTOPEIT, M.; HAMPRECHT, A.; HEINZ, W. et al. Diagnosis of invasive fungal diseases in haematology and oncology: 2018 update of the recommendations of the infectious diseases working party of the German society for hematology and medical oncology (AGIHO). **Mycoses**, v. 61, n. 11, p. 796-813. 2018.

SAH, R.; SOIN, A.S.; CHAWLA, S.; WADHWA, T.; GUPTA, N. Disseminated *Trichosporon asahii* infection in a combined liver-kidney transplant recipient successfully treated with voriconazole. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 7, p. 125-129. 2019.

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.

SEGRELLES-CALVO G, ARAÚJO GRS, LLOPIS-PASTOR E, FRASÉS S. *Trichosporon asahii* as Cause of Nosocomial Pneumonia in Patient With COVID-19: A Triple Co-infection. **Archivos de Bronconeumología**, v. 57, p. 46-48. 2021.

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

SIDRIM, J.J.; VASCONCELOS, D.C.; RIELLO, G.B.; GUEDES, G.M.; SERPA, R.; BANDEIRA ,T.J.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.; ROCHA, M.F.; BRILHANTE, R.S. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, v. 33, n. 1, p. 88-97. 2017.

SILVA, S.; RODRIGUES, C.F.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, M.E.; HENRIQUES, M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. **Journal of fungi (Basel)**, v.3, n. 1, p.: E8. 2017.

SINGH, S.; CAPOOR, M.R.; VARSHNEY, S.; GUPTA, D.K.; VERMA, P.K.; RAMESH, V. Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Infections Caused by *Trichosporon* Species: An Emerging Non-*Candida* and Non-*Cryptococcus* Yeast Worldwide. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 536-541. 2019.

SINGHI, P.; SAINI, A.G. Fungal and Parasitic CNS Infections Indian. **Journal of Pediatrics**, v. 8, n. 1, p. 83-90. 2019.

SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G.D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185. 2017.

TAKASHIMA, M.; SUGITA, T. Draft Genome Analysis of Trichosporonales Species That Contribute to the Taxonomy of the Genus *Trichosporon* and Related Taxa. **Journal of Medical Mycology**, v. 60, n. 2, p. 51-57. 2019.

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.; BOSCO-BORGEAT, M. E. Molecular Identification, Genotyping, and Antifungal Susceptibility Testing of Clinically Relevant *Trichosporon* Species from Argentina. **Medical Mycology**, v. 52, n. 4, p. 356–366, 2014.

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

VON LILIENFELD-TOAL, M.; WAGENER, J.; EINSELE, H., CORNELLY, O.A.; KURZAI, O. Invasive Fungal Infection. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 116, n. 16, p. 271-278. 2019.

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.

WANG, S.C.; DAVEJAN, P.; HENDARGO, K.J.; JAVADI-RAZAZ, I.; CHOU, A.; YEE, D.C.; GHAZI, F.; LAM, K.J.K.; CONN, A.M.; MADRIGAL, A.; MEDRANO-SOTO, A.; SAIER, M.H. Expansion of the Major Facilitator Superfamily (MFS) to include novel transporters as well as transmembrane-acting enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1862, n. 9, p. 183277. 2020.

WUYTS, DIJCK & HOLTAPPELS. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLOS Pathogens**, v. 14, n.10, p. e1007301. 2018.

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.

ZHAO, X; ZHAO, F; WANG, J; ZHONG, N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **RSC Advances**, v. 7, p. 36670-36683. 2017.

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.

APÊNDICES

APÊNDICE A: *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells.

Artigo publicado na revista *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021. Qualis A1. Fator de impacto: 5.293. Doi: 10.3389/fcimb.2021.645812.

***Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells**

Rossana de Aguiar Cordeiro^{1*§}, Ana Luiza Ribeiro Aguiar^{1§}, Bruno Nascimento da Silva¹, Lívia Maria Galdino Pereira¹, Fernando Victor Monteiro Portela², Zoilo Pires de Camargo², Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto³, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco¹, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,4}, José Júlio Costa Sidrim¹

¹ Federal University of Ceará, Brazil

² Federal University of São Paulo, Brazil

³ Federal University of Pernambuco, Brazil

⁴ State University of Ceará, Brazil

§ These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Rossana de Aguiar Cordeiro, rossanacordeiro@ufc.br (R.A.Cordeiro).

ABSTRACT

Persister cells are metabolically inactive dormant cells that lie within microbial biofilms. They are phenotypic variants highly tolerant to antimicrobials and, therefore, associated with recalcitrant infections. In the present study, we investigated if *Trichosporon asahii* and *T. inkin* are able to produce persister cells. *Trichosporon* are ubiquitous fungi, commonly found as commensals of the human skin and gut microbiota, and have been increasingly reported as agents of fungemia in immunocompromised patients. Biofilms derived from clinical strains of *T. asahii* (n=5) and *T. inkin* (n=7) were formed in flat-bottomed microtiter plates and incubated at 35°C for 48h, treated with 100 µg/ml amphotericin B (AMB) and incubated at 35 °C for additional 24h. Biofilms were scraped from the wells and persister cells were assayed for susceptibility to AMB. Additionally, we investigated if these persister cells were able to generate new biofilms and studied their ultrastructure and AMB susceptibility. Persister cells were detected in both *T. asahii* and *T. inkin* biofilms and showed tolerance to high doses of AMB (up to 256 times higher than the minimum inhibitory concentration). Persister cells were able to generate biofilms, however they presented reduced biomass and metabolic activity, and reduced tolerance to AMB, in comparison to biofilm growth control. The present study describes the occurrence of persister cells in *Trichosporon* and suggests their role in the reduced AMB susceptibility of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms.

Keywords: antifungal susceptibility; dormant cells; *Trichosporon*; amphotericin B; trichosporonosis.

Introduction

Trichosporon are ubiquitous fungi, commonly found as commensals of the human skin and gastrointestinal tract (Duarte-Oliveira et al., 2017). *Trichosporon* species are emerging opportunistic fungi that have been increasingly reported as agents of fungemia in the last years, especially in immunocompromised patients (Challapilla et al., 2019; Sah et al., 2019; Alp et al., 2020]. Furthermore, *Trichosporon* species have been reported as the second leading cause of invasive yeast infection in patients with malignant hematological diseases (Almeida Jr & Hennequin, 2015).

The ability of *Trichosporon* species to cause systemic infections is likely associated with the expression of virulence factors, such as extracellular lytic compounds, and, most importantly, biofilms (Montoya et al., 2017), microbial communities surrounded by a polymeric extracellular matrix (Zhao et al., 2017). This structure expresses several mechanisms to escape the action of antimicrobials, as well as to resist physical stress, desiccation, UV radiation, and host immune system (Polke et al., 2015; Martinez & Casadeval, 2007). Previous studies have shown that *T. asahii* and *T. inkin* biofilms produce extracellular protease (Cordeiro et al., 2015) and also show increased tolerance to antifungals (Cordeiro et al., 2019; Montoya et al., 2018; Almeida et al., 2016; Cordeiro et al., 2015). Indeed, *T. asahii* biofilms may be up to 16,000 times more resistant to voriconazole, the most active antifungal against *Trichosporon* planktonic cells (Di Bonaventura et al., 2006).

Fungal biofilms tolerate high antifungal concentrations by many simultaneous mechanisms (Taff et al., 2013). Previous studies conducted with *Candida albicans* have shown that antifungal tolerance may be related to the development of a subpopulation of dormant cells within biofilms, known as persister cells (Lafleur et al., 2006). Such persister cells have been related to relapsing infections, as they tolerate antifungal exposure and can

revert to an actively growing state, repopulating the biofilm, once treatment is ceased (Del Pozo, 2017).

Despite their relevance as emergent opportunistic species, few studies have addressed mechanisms of antifungal resistance of *Trichosporon* species in planktonic or sessile forms (Padovan et al., 2019; Kushima et al., 2017; Li et al., 2017; Kushima et al., 2015). The present study aimed to evaluate if *T. asahii* and *T. inkin* are prone to develop dormant persister cells within biofilms and to describe their importance for antifungal tolerance.

Material and Methods

Microorganisms

A total of 12 strains of *Trichosporon* were evaluated in this study: five *T. asahii* (CEMM 05-6-072, GenBank JX124945, urine; CEMM 05-6-073, GenBank JX124961, catheter; CEMM 03-1-072, GenBank MW291565; blood; CEMM 80, GenBank MW291562, tracheal aspirate; and CEMM 81, GenBank MW291563, blood) and seven *T. inkin* strains (CEMM 01-1-143, GenBank JX125002.1; skin lesion; CEMM 01-1-144, GenBank JX124989.1; skin lesion; CEMM 01-1-145, GenBank JX124958.1; urine; CEMM 05-6-057, GenBank HM46988.1, white *pie*dra; CEMM 05-6-074, JX124953; urine; CEMM 05-6-075, GenBank JX124985, perigenital area; CEMM 03-1-073, GenBank MW291566, nails). Strain identification was based on analysis of micromorphological features on malt agar [De Hoog et al., 2000] and sequencing of intergenic spacer region IG1 of rDNA [Silvestre Junior et al., 2010]. Strains were recovered from storage and maintained on potato dextrose agar (PDA; Himedia, India), at 35 °C, for 48 h. The isolates belong to the culture collection of the Specialized Medical Mycology Center of Federal University of Ceará, Brazil. The chosen *T. asahii* strains do not have mechanisms of acquired resistance to amphotericin B (wild-type),

according to the epidemiological cutoff values (ECVs), proposed by Francisco et al. (2019) for the species.

C. albicans ATCC 10231 was included as internal control for persister cell isolation; moreover, *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as quality controls for susceptibility assays (CLSI, 2008).

Drugs

Stock solution of amphotericin B (AMB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, United States) was prepared as recommended by the document M27-A3 (CLSI, 2008). Serial two- fold dilutions of AMB were performed in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, MO, United States), buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS; Sigma- Aldrich, MO, United States).

Biofilm formation

Biofilm growth was induced as described by Cordeiro et al. (2015). Strains of *T. asahii* (n=5) and *T. inkin* (n=7) were grown on potato dextrose agar (PDA, Himedia, Mumbai, India) at 35°C for 48 h. Aliquots of 200 µl of fungal suspension adjusted to 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium were added to flat-bottomed 96-well polystyrene microplates and incubated at 35°C for 6h (adhesion period) at 80 rpm. After incubation, non-adherent cells were removed by washing with sterile phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20 (PBS- Tween 20). Afterwards, the wells were filled with RPMI medium and incubated at 35°C for 48h (maturation period) at 80 rpm.

Detection of persister cells

The presence of persister cells in *Trichosporon* spp. biofilms was evaluated according to the methodology described by Lafleur et al. (2006) for *C. albicans* biofilms. Mature biofilms were washed with sterile PBS-Tween 20 and then treated with 100 µg/ml AMB and incubated at 35°C for additional 24h (La Fleur et al., 2006). Thereafter, the wells were washed with sterile PBS-Tween 20, scraped with a pipette tip and the cells were resuspended in 100 µl in sterile PBS. Suspensions were serially diluted, plated on PDA agar and incubated at 35°C for 24h for viable cell counting. Cells that survived exposure to 100 µg/mL AMB treatment were considered persister cells (La Fleur et al., 2006) Biofilms formed in RPMI 1640 medium without antifungal drug were included as biofilm growth control. *C. albicans* ATCC 10231 was included as control for validation of the methodology described by La Fleur et al. (2006), as it has been shown to produce dormant cells in the presence of AMB (Boucherit et al., 2007). All assays were performed in triplicate, at two independent experiments.

Regeneration of biofilms by persister cells

After observing the presence of persister cells in *Trichosporon* biofilms, we tested their ability to regenerate biofilms on an abiotic surface. Persisters cells were induced and isolated as described above. Thereafter, cell suspensions were adjusted in RPMI medium, transferred to flat-bottomed 96-well polystyrene plates and incubated at 35°C for 48h at 80 rpm order to form progeny biofilms. Results were compared with the following paired controls: (1) mature biofilms produced by planktonic cells; and (2) progeny biofilms produced by cells detached from mature biofilms. Biofilms were evaluated for metabolic activity and biomass, by the XTT reduction (Cordeiro et al., 2015) and crystal violet staining assays (Pierce et al., 2015), respectively.

AMB susceptibility of persister cells, biofilm cells and planktonic cells

Susceptibility of persister cells to AMB was accessed by the broth microdilution method (CLSI, 2008). For isolation of persister cells, 48 h-mature biofilms grown in RPMI- medium without antifungals were incubated with 100 µg/ml AMB for 24h. Progeny biofilms were formed by inoculating persister cells into drug-free RPMI medium and repeating the biofilm growth procedure described above. Results were compared with the following paired controls: (1) planktonic cells; (2) mature biofilms produced by planktonic cells; (3) progeny biofilms produced by cells detached from mature biofilms; and (4) progeny biofilms produced by persister cells. Planktonic cells were obtained from 48h-culture on PDA at 35°C. Cell suspensions from biofilms were obtained after scraping of the wells and centrifugation at 9,167 xg for 10 min. Inocula were prepared in sterile saline solution and adjusted to a final concentration of $0.5\text{--}2.5 \times 10^3$ cells/ml in RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS. AMB was tested in concentrations ranging from 0.25 to 128 µg/ml (Cordeiro et al., 2015). Plates were incubated at 35°C for 48 h and fungal growth was visually determined analyzed. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration able of inhibiting 100% of visual fungal growth. Isolates were tested in triplicate, at two independent experiments. Controls were grown in RPMI medium without AMB. *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were included as quality controls.

Biofilm structure and morphology

Structural analysis of *Trichosporon* biofilms (*T. asahii*, CEMM 05-6-072, urine; *T. inkin*, CEMM 05-6-074, urine) was performed by scanning electron microscopy (SEM) and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), as described elsewhere (Cordeiro et al. 2017, Di Bonaventura et al., 2006). Biofilms were formed on Thermanox® slides (Thermo Fisher

Scientific, NY, USA) in 12-well polystyrene plates with RPMI medium as described above and incubated at 35°C for 48h at 80 rpm. Paired controls were grown in RPMI medium without antimicrobials. For SEM analysis, biofilms were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.15M sodium cacodylate buffer and incubated overnight at 4°C. Biofilms were washed twice with 0.15M cacodylate buffer for 5 min and dehydrated in ethanol. Slides were dried with hexamethyldisilazane (Polysciences Europe, Germany) for 30 min, coated with 10nm gold (Emitech Q150T, Lewes, UK) and observed in a SEM (FEI Inspect S50, Thermo Fisher Scientific, Hillsboro, Oregon, USA) in the high vacuum mode at 15 kV. For CLSM, biofilms were stained with the Live/Dead™ (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) and evaluated with a confocal Nikon C2 C microscope (Nikon, Melville, NY, USA), at 488 nm, for the detection of SYTO 9 (live cells) and at 561 nm, for the detection of propidium iodide (dead/damaged cells). Images were processed using ImageJ Software (Collins, 2007). The software COMSTAT was used for quantitative analysis of the image stacks produced by CLSM.

Statistical analysis

Parametric data were analyzed using Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test. For data with asymmetry, Wilcoxon's or Friedman's nonparametric tests followed by Dunn's post-hoc test were applied. P-values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical Analysis was performed using the software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, USA).

Results

Presence of persister cells in Trichosporon biofilms

The colony-forming unit (CFU) counts showed the presence of viable cells in *Trichosporon* biofilms after exposure to 100 µg/mL AMB. Counts ranged from 1.1×10^5 to 2.26×10^5 CFU/mL for *T. asahii* and 2.6×10^4 to 2.5×10^5 *T. inkin* strains (Figure 1A). Biofilm growth controls ranged from 3.53×10^6 to 7.7×10^6 CFU/mL and 1.12×10^6 to 5.75×10^6 , for *T. asahii* and *T. inkin*, respectively. Persister cells consisted approximately 4% of viable cells for both *T. asahii* and *T. inkin* biofilms (Figure 1B). Statistically significant differences were observed when compared to drug-free growth control ($P < 0.05$). The number of persister cells of *C. albicans* (2×10^4 CFU/ml) corresponds to approximately 1.45% of the total number of cells within biofilm growth control (1.38×10^6 CFU/ml).

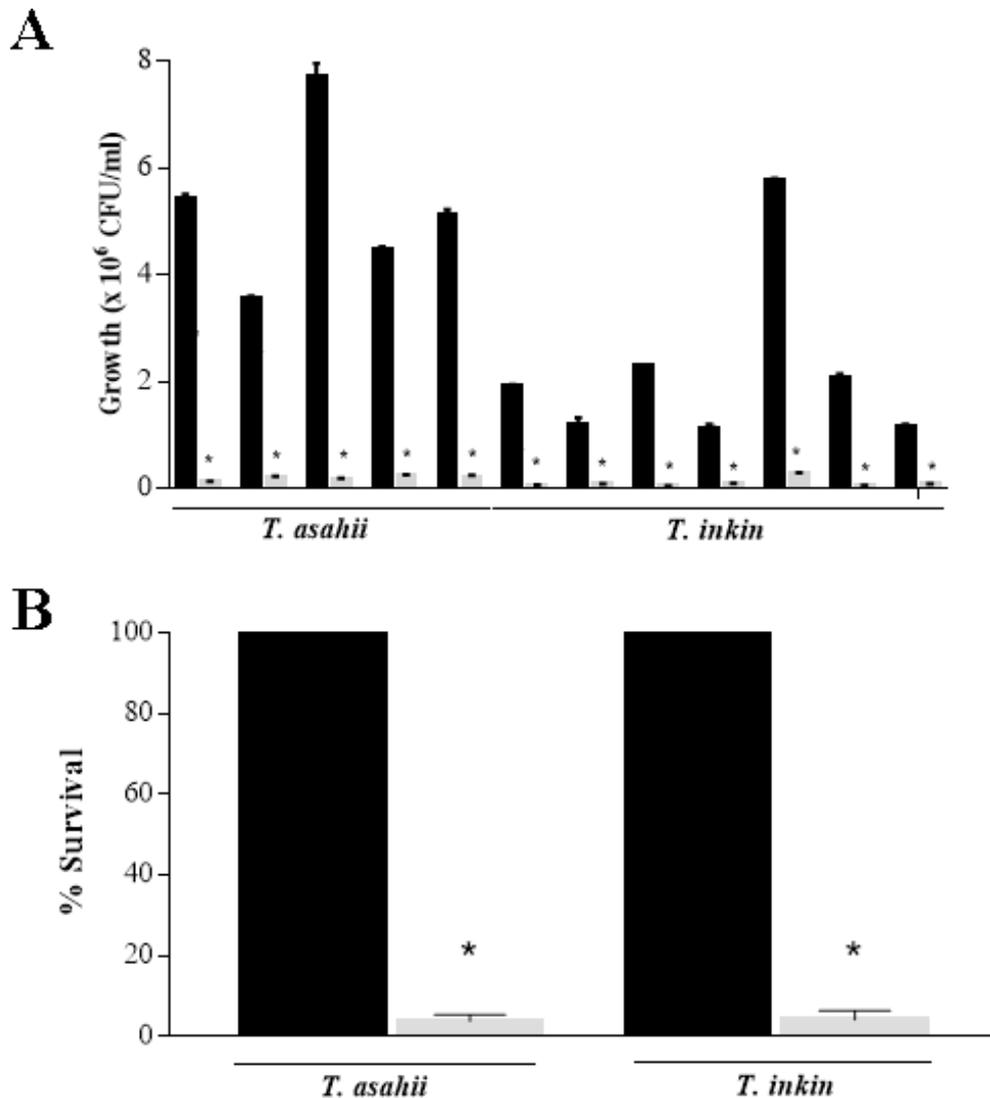


Figure 1. Detection of persister cells in *T. asahii* and *T. inkin* biofilms (grey bars). A. Mature biofilms formed in RPMI medium were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMB. B. Survival of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms challenged with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMB. Biofilm controls were grown in drug-free RPMI medium (black bars). Values are shown as mean \pm SD. * Statistically significant differences when compared to the respective drug-free control ($P < 0.05$).

Persister cells of Trichosporon can form new biofilms

Mature *Trichosporon* biofilms were challenged with AMB (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), then, progeny biofilms were formed by inoculating persister cells into RPMI medium, as previously described. Persister cells from each strain were able to form progeny biofilms. In general, a significant reduction in metabolic activity and biomass was observed for both species, when compared to progeny biofilms produced by cells detached from mature biofilms ($P < 0.05$), as shown in Figure 3.

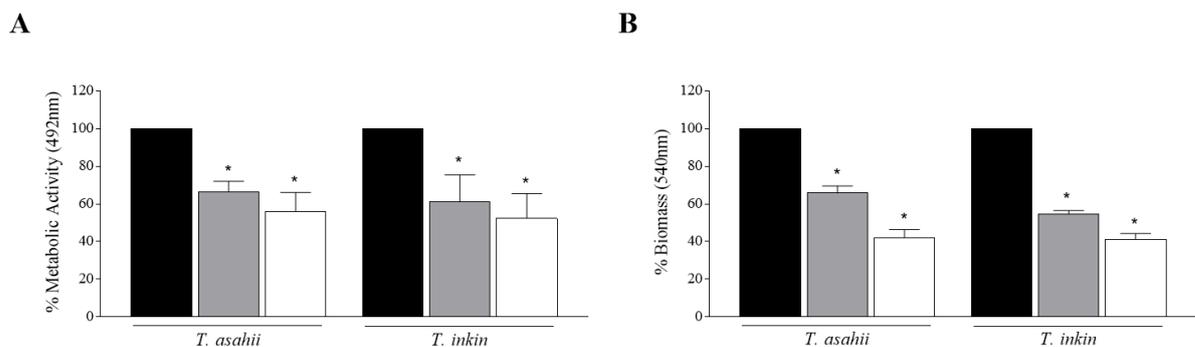


Figure 2. Regeneration of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms. Biofilms were formed in RPMI medium and produced by planktonic cells (black bars), cells detached from mature biofilms (grey bars) or persister cells (white bars). Metabolic activity and total biomass were expressed as relative percentages of absorbance by the XTT reduction (A) and crystal violet staining (B) assays. * Statistically significant differences when compared to the biofilm growth control produced by planktonic cells ($P < 0.05$).

Persister cells showed tolerance to AMB

Persister cells presented increased tolerance to AMB, compared to planktonic cells and biofilm-detached cells (Table 1). MICs against persister cells from *T. asahii* and *T. inkin* biofilms ranged from 64 to >128 µg/mL (geometric mean: 111.43 µg/mL and 115.93 µg/mL, respectively). MICs against planktonic cells ranged from 0.25 to 2.0 µg/mL for *T. asahii* (geometric mean: 1.41 µg/mL) and 0.5 µg/mL to 1.0 µg/mL for *T. inkin* (geometric mean: 1.0 µg/mL). MICs against mature biofilm-detached cells ranged from 16 to 64 µg/mL (geometric mean: 36.75 µg/mL and 28.98 µg/mL, for *T. asahii* and *T. inkin*, respectively). MICs against progeny biofilm-detached cells ranged from 8 to 32 µg/mL (geometric mean: 21.11 µg/mL and 14.5 µg/mL, for *T. asahii* and *T. inkin*, respectively). Cells from progeny biofilms from persister cells showed increased susceptibility to AMB, when compared to other biofilm-derived cells, displaying MICs ranging from 2 to 8 µg/mL (geometric mean: 5 µg/mL for both species). AMB MIC of control strains *C. krusei* ATCC and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were according CLSI guidelines (CLSI, 2008).

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of amphotericin B (AMB) against persister cells, biofilm cells and planktonic cells of *T. asahii* and *T. inkin* strains.

Species/ Strains	AMB MIC ($\mu\text{g/mL}$)*					
	Planktonic cells ^a	Biofilm cells ^b	Progeny biofilm ^c	Persister cells ^d	Progeny biofilm-persister cells ^e	
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	0.5	32	16	128	8
	CEMM 05-6-073	1	16	16	64	8
	CEMM 03-1-072	2	32	32	128	8
	CEMM 80	0.25	64	16	>128	2
	CEMM 81	0.5	64	32	>128	4
	Geometric mean	1.41	36.75	21.11	111.43	5
<i>T. inkin</i>	CEMM 01-1-143	0.5	16	8	>128	8
	CEMM 01-1-144	0.5	32	16	128	4
	CEMM 01-1-145	0.5	32	16	128	4
	CEMM 05-6-057	1	32	16	128	8
	CEMM 05-6-074	0.5	16	8	64	2
	CEMM 05-6-075	1	32	16	128	8
	CEMM 03-1-073	1	64	32	128	8
	Geometric mean	1	28.98	14.5	115.93	5

* 100% inhibition of visible fungal growth.

^a Obtained from 48h-cultures on PDA at 35 °C.

^b Disaggregated cells from mature biofilms (48h) produced by planktonic cells.

^c Disaggregated cells from progeny mature biofilms (48h) produced by cells detached from mature biofilms.

^d Persister cells.

^e Disaggregated cells from progeny mature biofilms (48h) produced by persister cells.

Biofilm ultrastructure

Persister cells were compared to biofilm growth control by SEM (Figure 3) and CLSM (Figure 4). Structured biofilms with high cell density enclosed by a dense extracellular material were seen in drug-free growth controls (Figures 3A, 3B, 4A, 4B). AMB (100 $\mu\text{g/mL}$) was able to disrupt the three-dimensional structure of mature biofilms, leaving deformed fungal structures (Figures 3C, 3D) and rare live cells (Figures 4C, 4D). Persister cells were able to form progeny biofilms with fewer filaments and less extracellular matrix (Figures 3E, 3F, 4E, 4F) than biofilm growth control. Progeny biofilms produced by cells detached from mature biofilms also showed fewer filaments and less extracellular matrix than the drug-free growth control (Figures 3G, 3H, 4G, 4H).

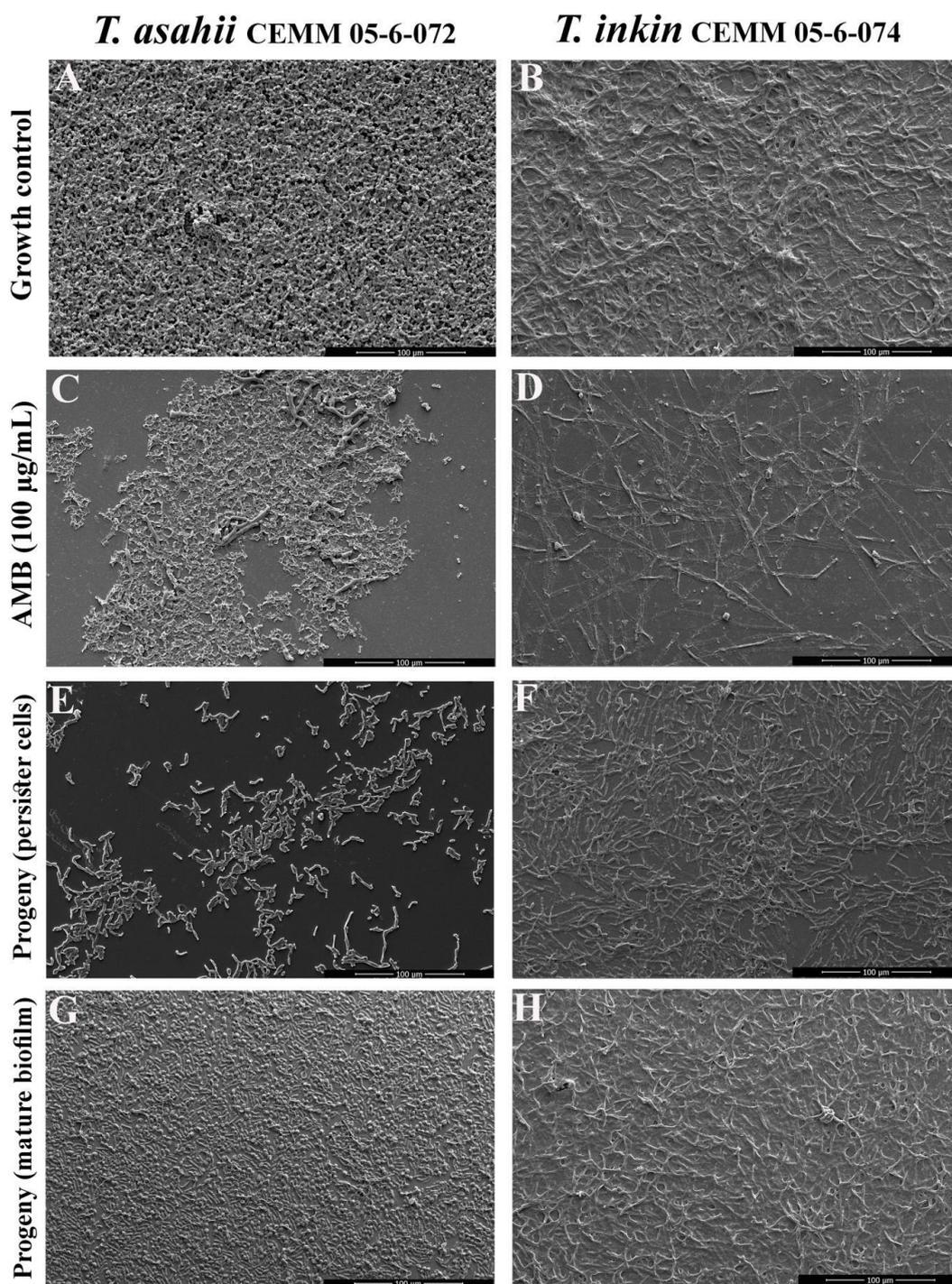


Figure 3. Ultrastructure of *T. asahii* CEMM 05-6-072 and *T. inkin* CEMM 05-6-074 biofilms by SEM. Sessile cells were formed on Thermanox™ coverslips in drug-free RPMI medium as controls (A, B). Mature biofilms (48h) were challenged with 100 µg/mL AMB and incubated at 35 °C for 24h (C, D). Surviving cells were considered persisters. Biofilms were then scrapped with a pipette tip and inocula were prepared in RPMI medium. Progeny biofilms produced by persister cells (E, F) or mature biofilms-detached cells were formed in RPMI medium.

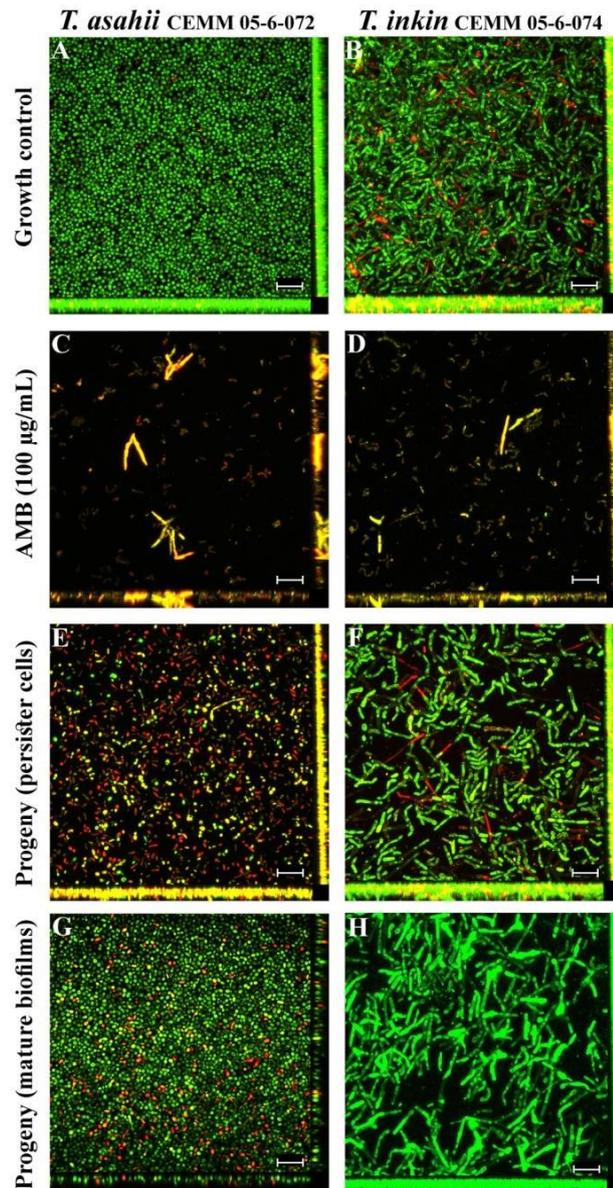


Figure 4. Scanning electron microscopy of *T. asahii* CEMM 05-6-072 and *T. inkin* CEMM 05-6-074 biofilms. Sessile cells were formed on Thermanox™ coverslips in drug-free RPMI medium as controls (A, B). Mature biofilms (48h) were challenged with 100 µg/mL AMB (C,D) for detection of persister cells. Progeny biofilms produced by persister cells (E, F) or mature biofilms-detached cells were formed in RPMI medium (G, H). Live cells are shown in green and dead/damaged cells are shown in yellow/red after stain with SYTO9 and propidium iodide, respectively. Magnification: 400x. Bar: 100 µm.

Discussion

Several reports support the claim that antifungal resistance in *Trichosporon* is emerging worldwide (Santos et al., 2019; Francisco et al., 2019; Padovan et al., 2019; Kushima et al., 2012; Colombo et al., 2011). Besides intrinsic tolerance to caspofungin, many studies have shown resistance to fluconazole and voriconazole among *Trichosporon* strains (Santos et al., 2019; Padovan et al., 2019; Lemes et al., 2010; Falk et al., 2003). Although the mechanisms of resistance in *Trichosporon* are not fully understood, it is known that efflux pumps may play a role as drug transporters in fluconazole-resistant *T. asahii* strains (Padovan et al., 2019) and long-term exposure to fluconazole may induce the amino acid substitution of Erg11p and multidrug-resistance in *T. asahii* (Kushima et al., 2012).

Antifungal tolerance in *Trichosporon* biofilms is widely reported (Cordeiro et al., 2015; Iturrieta-González et al., 2014; Di Bonaventura et al., 2006). In general, some mechanisms associated with antifungal tolerance have already been described in fungal biofilms and include increased efflux pump activity; production of extracellular matrix rich in carbohydrates and nucleic acids, causing drug sequestration (Wuyts et al., 2018; Cohen et al., 2013); expression of resistance genes (Li et al., 2015); reduction of cell ergosterol concentration (Mukherjee et al., 2003) and production of persistent cells (Wuyts et al., 2018; Delarze et al., 2015; Al-Dhaheri & Douglas, 2008; LaFleur et al., 2006).

The term "persisters" was first used by Bigger in 1944 to describe a group of *Staphylococcus aureus* cells who had the ability to survive when exposed to sufficient penicillin concentrations to kill dividing cells (Bigger, 1994). Many studies have been developed to better understand the behavior of persister cells, especially regarding antimicrobial tolerance and their impact on the progress and chronicity of infections (Wuyts et al., 2018). La Fleur et al. (2006) was the first to describe the occurrence of persister cells in fungal biofilms, presenting evidence that the phenomenon occurs in *C. albicans* biofilms.

Since then, many studies have described the occurrence and general properties of persister cells in fungal biofilms.

Persister cells are phenotypic variants that are maintained in a state of dormancy, being able to survive high concentrations of antifungals as well as the oxidative stress induced by these drugs through the activation of metabolic response pathways and intracellular storage of glycogen and trehalose (Wuyts et al., 2018). In addition to *C. albicans*, the formation of persister cells has been described in biofilms of *C. parapsilosis*, *C. krusei* (Al-Dhaheri & Douglas, 2008) and *Saccharomyces cerevisiae* (Bojsen et al., 2014).

In the present study, we observed that *T. asahii* and *T. inkin* produce persister cells inside their biofilms. All the strains studied were able to form persister cells. Using the methodology proposed by LaFleur for the detection of persister cells in *C. albicans* biofilms, it was observed that the proportion of persistent cells varied from 2 to 5% for *T. asahii* and from 2 to 6% for *T. inkin*. These values are higher than those found in *C. albicans* (LaFleur et al., 2006), *C. parapsilosis* and *C. krusei* biofilms (Al-Dhaheri & Douglas, 2008), which usually comprise up to 2% of the total population. We do not know if these results indicate intrinsic properties of *Trichosporon* biofilms or if they are derived from the small number of strains investigated in the present study.

Persister cells of both species were able to originate progeny biofilms, however, these biofilms presented less biomass and metabolic activity than the progeny biofilms produced by cells detached from mature biofilms. These results were corroborated by the ultrastructural analysis, which revealed that the biofilms derived from persister cells have lower cell density and less extracellular matrix. Detached cells from these biofilms were less tolerant to AMB than persister cells contained in the starter inoculum. These results suggest that *Trichosporon* persister cells are not mutants but phenotypic variants of regular cells, as previously

demonstrated for other fungal species (Wuyts et al., 2018; Al-Dhaheri & Douglas, 2008, LaFleur et al., 2006).

Several experimental evidences suggest that persister cells are directly related to the occurrence of recalcitrant infections. Studies conducted on *C. albicans* biofilms have shown that metabolic pathways related to oxidative stress, heat-shock proteins production and extracellular matrix synthesis are up-regulated in persisters cells (Li et al., 2015). La Fleur et al. (2006) suggested that AMB tolerance of *C. albicans* persister cells may be related to the reduced level of cellular ergosterol. These factors may contribute to escaping from phagocytosis and increased antifungal tolerance of persister cells (Wuyts et al., 2018).

In conclusion, the results presented here show that *T. asahii* and *T. inkin* produce persistent cells in their biofilms. These cells have a high tolerance to AMB and provide an inoculum for cell growth and new biofilm formation. Future studies should be conducted in order to understand the genetic regulation associated with the production of persistent cells in *Trichosporon* biofilms and their phenotypic tolerance to AMB. Physicians should be aware that the production of persistent cells within biofilms may be related to therapeutic failure in invasive trichosporonosis.

Author contributions

RAC and ALRA designed the research, analyzed the data and wrote the manuscript. ALRA, BNS, MLGP, and FVMP performed the experiments. DSCMCB captured CLSM images. DSCMCB, ZPC, RGLN, MFGR and JJCS critically revised the manuscript. All authors read and approved of the manuscript.

Conflict of interest

None to declare.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (Process 430193/2018-1). The authors are grateful to Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES and Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-MCTIC.

Reference

Al-Dhaheri RS, Douglas LJ. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* (2008) 52:1884-1887. doi.org/10.1128/AAC.01473-07

Almeida Jr JN, Hennequin C. Invasive *Trichosporon* Infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. *Front Microbiol* (2016) 7:1629. doi:10.3389/fmicb.2016.01629

Alp S, Gulmez D, Ayaz C M, Arıkan-Akdaglı S, Akova M. Fungemia due to rare yeasts in a tertiary care university center within 18 years. *Mycoses* (2020) 63:488-493. doi:10.1111/myc.13072

Bigger J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet* (1944) 244:497-500. doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3

Bojsen R, Regenber B, Folkesson A. *Saccharomyces cerevisiae* biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. *BMC Microbiol* (2014) 14:305. doi.org/10.1186/s12866-014-0305-4

Boucherit Z, Seksek O, Bolard J. Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry. *Med Mycol* (2007) 45(6): 525-533. doi: 10.1080/13693780701487821

Challapilla M, Patel K, Patel B, Soman R, Rodrigues C, Shetty A. *Trichosporon*-blood stream infection. *J Assoc Physicians India* (2019) 67:19-21. PMID: 31304699.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition. In: *CLSI document M27-A3*. Wayne, PA (2008).

Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* (2013)13:632-642. doi: 10.1016 / j.chom.2013.05.009

Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. (2007) 43:25-30. doi: 10.2144/000112517

Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev* (2011) 24:682-700. doi: 10.1128/CMR.00003-11

Cordeiro RA, Aguiar ALR, Pereira VS, Pereira LMG, Portela FVM, Brilhante RSN, Camargo ZP, Sidrim JJC, Castelo-Branco DSCM, Rocha MFG. Sodium butyrate inhibits planktonic and sessile cells of *Trichosporon* spp. *Microb Pathog* (2019) 130:219-225. doi: 10.1016/j.micpath.2019.03.013

Cordeiro RA, Serpa R, Mendes PBL, Evangelista AJJ, Colares ARC, Franco JS, Pereira VS, Alencar LP, Oliveira JS, Camargo ZP, Lima-Neto RG, Castelo Branco DSCM, Brilhante RSN, Rocha MFG, Sidrim JJC. The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. *Biofouling*, (2017) 33: 640-650. doi: 10.1080/08927014.2017.1350947

Cordeiro R, Serpa R, Alexandre CFU, Marques FJF, Melo CVS, Franco JS, Evangelista AJJ, Camargo ZP, Brilhante RSN, Rocha MFG, Moreira JL, Bandeira TJPG, Sidrim JJ. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. *J Med Microbiol* (2015) 64:1277-1286. doi: 10.1099/jmm.0.000159

De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueiras MJ, *Atlas of Clinical Fungi* (2000), 2nd ed. Washington: ASM Press.

Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* (2018) 16:51-65. doi: 10.1080/14787210.2018.1417036.

Delarze E, Sanglard D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resist Updat* (2015) 23: 12-19. doi.org/10.1016/j.drug.2015.10.001.

Di Bonaventura G, Pompilio A, Picciani C, Iezzi M, D'antonio D, Piccolomini R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* (2006) 50:3269-3276. doi: 10.1128/AAC.00556-06

Duarte-Oliveira C, Rodrigues F, Gonçalves SM, Goldman GH, Carvalho A, Cunha C. The cell biology of the *Trichosporon*-host interaction. *Front Cell Infect Microbiol* (2017) 7:118. doi: 10.3389/fcimb.2017.00118

Falk R, Wolf DG, Shapiro M, Polacheck I. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* isolates are susceptible to voriconazole. *J Clin Microbiol* (2003) 41: 911. doi: 10.1128/JCM.41.2.911.2003

Francisco EC, de Almeida Junior JN, de Queiroz Telles F, Aquino VR, Mendes AVA, de Andrade Barberino MGM, Castro PTO, Guimarães T, Hahn RC, Padovan ACB, Chaves GM, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. *Clin Microbiol Infect* (2019) 25: 909.e1-909.e5. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.026.

Iturrieta-González IA, Padovan ACB, Bizerra FC, Hahn RC, Colombo AN. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B, *Plos one* (2014) 9: e109553. doi: 10.1371/journal.pone.0109553

Kushima H, Tokimatsu I, Ishii H, Kadota J. Antifungal susceptibility and drug-resistant mechanism of *Trichosporon*. *Med Mycol J* (2015) 56:J123-J128. doi: 10.3314/mmj.56.J123

Kushima H, Tokimatsu I, Ishii H, Kawano R, Shirai R, Kishi K, Hiramatsu K, Kadota J. Cloning of the lanosterol 14- α -demethylase (*ERG11*) gene in *Trichosporon asahii*: a possible

association between G453R amino acid substitution and azole resistance in *T. asahii*. *FEMS Yeast Res* (2012) 12: 662-667. doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00816.x

Kushima H, Tokimatsu I, Kawano R, Watanabe K, Kadota Jun-ichi. A new amino acid substitution at G150S in lanosterol 14- α demethylase (Erg11 protein) in multi-azole-resistant *Trichosporon asahii*. *Med Mycol J* (2017) 58:E23-E28. doi:10.3314/mmj.16-00027

LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* (2006) 50:3839–3846. doi.org/10.1128/AAC.00684-06

Lemes RML, Lyon JP, Moreira LM, Resende MA. Antifungal susceptibility profile of *Trichosporon* isolates: correlation between CLSI and etest methodologies. *Braz J Microbiol* (2010) 41:310-315. doi.org/10.1590/S1517-83822010000200008

Li P, Seneviratne CJ, Alpi E, Vizcaino JA, Jin L. Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of *Candida albicans* biofilm persisters. *Antimicrob Agents Chemother* (2015) 59:6101-6112. doi.org/10.1128/AAC.00543-15

Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl Environ Microbiol* (2007) 73:4592-4601. doi: 10.1128/AEM.02506-06

Montoya AM, Elizondo-Zertucge M, Treviño-Rangel RJ, Becerril-Gargia M, González GM. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients. *Rev Iberoam Micol* (2018) 35:22-26. doi: 10.1016/j.riam.2017.02.008

Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* (2003) 71: 4333-4340. doi: 10.1128/IAI.71.8.4333-4340.2003

Santos CO, Zijlstra JG, Porte RJ, Kampinga GA, Van Diepeningen AD, Sinha B, Bathoorn E. Emerging pan-resistance in *Trichosporon* species: a case report. *BMC Infect Dis.* (2016) 16:148. doi: 10.1186/s12879-016-1477-3

Padovan ACB, Rocha WPDS, Toti ACM, Jesus DFF, Chaves GM, Colombo AL. Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: Triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis. *Fungal Genet Biol* (2019) 133:103267. doi:10.1016 / j.fgb.2019.103267

Pierce CG, Chaturvedi AK, Lazzell AL, Powell AT, Saville SP, McHardy SF, Lopez-Ribot JL. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. *NPJ Biofilms and Microbiomes* (2015) 1:15012. doi: 10.1038/npjbiofilms.2015.12

Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol* (2015) 91:139-235. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002

Sah R, Soin AS, Chawla S, Wadhwa T, Gupta N. Disseminated *Trichosporon asahii* infection in a combined liver-kidney transplant recipient successfully treated with voriconazole. *Immun Inflamm Dis* (2019) 7:125-129. doi:10.1002/iid3.250.

Silvestre Junior AM, Miranda MABR, Camargo ZP. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a Brazilian population. *Braz J Microbiol* (2010) 41:628-634. doi.org/10.1590/S1517-83822010000300013

Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol* (2013) 8:1325-1337. doi: 10.2217/fmb.13.101

Wuyts J, Van Dijck P, Holtappels M. Fungal persister cells: the basis for recalcitrant infections? *PLoS Pathog* (2018) 14: e1007301. doi: 10.1371 / journal.ppat.1007301

Zhao X, Zhao F, Wang J, Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances* (2017) 7: 36670-36683. doi.org/10.1039/C7RA02497E

APÊNDICE B: Inhibition of efflux in *Trichosporon* enhances antifungal susceptibility and disrupts biofilm structure and functioning

Artigo submetido na revista *Mycoses*. 2022. Fator de impacto: 4.377.

Inhibition of efflux in *Trichosporon* enhances antifungal susceptibility and disrupts biofilm structure and functioning

Autores: Ana Luiza Ribeiro Aguiar, Bruno Nascimento da Silva, Nicole de Mello Fiallos, Lívia Maria Galdino, Maria Laína Silva, Fernando Victor Monteiro Portela, José Júlio Costa Sidrim, Marcos Fábio Gadelha Rocha, Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, Rossana de Aguiar Cordeiro.

Abstract

Trichosporon spp. are emerging opportunistic fungi commonly found in human skin and gut microbiota. They have been related to invasive infections, especially in patients with hematological malignancies. Currently, triazoles and amphotericin B have been used as first-line treatment in patients with invasive trichosporonosis, however increasing resistance to antifungals and therapeutic failure have been reported. The present study investigated the *in vitro* effect of promethazine (PMZ), an inhibitor of efflux pumps, as strategy to control *T. asahii* and *T. inkin*. PMZ was tested against *T. asahii* (n = 5) and *T. inkin* (n = 7) clinical strains. Planktonic cells were evaluated for antifungal susceptibility to PMZ, interaction with antifungals, as well as inhibition of efflux in an ethidium bromide accumulation assay. The effect of PMZ was also studied on biofilms for metabolic activity, biomass production, interaction with antifungals, reduction of

persister cells, quantification of carbohydrates and proteins, and ultrastructure. PMZ inhibited completely *T. asahii* and *T. inkin* planktonic cells at concentrations ranging from 32 to 256 µg/ml. Subinhibitory concentrations of PMZ (0.125xMIC and 0.25xMIC) inhibited efflux activity in *Trichosporon*. Biofilms at different stages of development were completely abolished by PMZ at planktonic MIC and 10xMIC. Regarding the drug interaction test, PMZ potentiated the action of AMB and FLC both in planktonic cells and biofilms. PMZ affected the morphology of *Trichosporon* spp., disrupting biofilms and altering the amount of carbohydrates and proteins. Additionally, mature biofilms pre-exposed to subinhibitory PMZ produced fewer persisters cells. Therefore, the present study showed indirect evidences of the occurrence of efflux pumps in *Trichosporon* spp. and opens a perspective for this target in the control of trichosporonosis.

Keywords: Antifungal resistance; biofilms; efflux pumps; promethazine; invasive trichosporonosis; persister cells.

INTRODUCTION

Invasive fungal infections affect more than 2 million of people worldwide annually (Brown *et al.*, 2012), being associated with high mortality and morbidity rates (Rauseo *et al.*, 2020; Rodrigues & Nosanchuk, 2020). *Trichosporon* spp. are yeast-like fungi considered opportunistic pathogens known to cause superficial infection such as white *pie*dra, onychomycosis and tinea pedis (Colombo *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2019). Furthermore, *Trichosporon* species have being recognized as emerging agents of systemic infections (Guo *et al.*, 2019; Ramírez & Moncada, 2019; Singh *et al.*, 2019). Risk factors for *Trichosporon* systemic infections include HIV infection, organ transplantation, diabetes, use of immunosuppressive agents and neutropenia (Li *et al.*, 2020). Invasive trichosporonosis has been reported as the second-most common yeast infection in patients with hematological malignancies, with mortality rates to up 90% (Colombo *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 2018; Kourt & Roilides, 2022).

Treatment of invasive trichosporonosis remains controversial, as consensual clinical guidelines are not available. Triazoles show better results when compared to amphotericin B (Nobrega *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020; Foster *et al.*, 2018). In addition, the antifungal arsenal to combat invasive trichosporonosis is limited by issues related to intrinsic resistance to echinocandins and reduced susceptibility to amphotericin B and fluconazole (Arastehfar *et al.*, 2021; Foster *et al.*, 2018; Kourt & Roilides, 2022). Besides, breakthrough trichosporonosis is related to decreased susceptibility to antifungals, with most cases reported after the use of echinocandins, amphotericin B or fluconazole (Ramírez & Moncada, 2019; Li *et al.*, 2020).

In addition to the reduced antifungal susceptibility of planktonic cells, *Trichosporon* spp. biofilms show remarkable tolerance to antifungals, being sessile cells at least 1,000 times more tolerant than their planktonic counterparts (Iturrieta-González *et al.*, 2014, Di Bonaventura *et al.*, 2006; Cordeiro *et al.*, 2015). Although antifungal resistance mechanisms in *Trichosporon* spp. are not fully understood, experimental evidence indicated that efflux pump hyperactivity may impair fluconazole susceptibility in *T. asahii* and could be considered a potential mechanism for resistance

in the specie (Padovan *et al.*, 2019). Considering the limited number of antifungals available for treating invasive trichosporonosis infection, the emergence of azole resistance – mainly fluconazole – among *T. asahii* clinical species (Francisco *et al.*, 2019; Padovan *et al.*, 2019) is a warning signal that cannot be ignored.

The aim of the present study was to evaluate the effect of pharmacological inhibition of efflux pumps on the antifungal susceptibility of planktonic and sessile cells of *T. asahii* and *T. inkin*. Clinical strains were treated with promethazine – a broad efflux pumps inhibitor – and then challenged with fluconazole and amphotericin B. The effect of promethazine on *Trichosporon* biofilms was also evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms

A total of 12 strains of *Trichosporon* spp. were evaluated in this study: *T. asahii* n=5 (CEMM 05-6-072, GenBank JX124945, urine; CEMM 05-6-073, GenBank JX124961, catheter; CEMM 03-1-072, GenBank MW291565, blood; CEMM 80, GenBank MW291562, tracheal aspirate; CEMM 81, GenBank MW291563, blood) and *T. inkin* n=7 (CEMM 01-1-143 , GenBank JX125002.1; skin lesion; CEMM 01-1-144, GenBank JX124989.1; skin lesion; CEMM 01-1-145, GenBank JX124958.1, urine; CEMM 05-6-057, GenBank HM46988.1, white piedra; CEMM 05-6-074 , GenBank JX124953, urine; CEMM 05-6-075, GenBank JX124985, perigenital area; CEMM 03-1-073, GenBank MW291566, nails). Isolates belong to the culture collection of the Specialized Medical Mycology Center of Federal University of Ceará, Brazil. Fungal strains were recovered from storage and maintained on potato dextrose agar (PDA; Himedia, India), at 35°C for 48 h. Identification was based on analysis of micromorphology on malt agar (Himedia, Brazil) (De Hoog *et al.*, 2000) and rDNA intergenic spacer (IGS) region sequencing (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005). *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as quality controls for susceptibility assays (CLSI, 2008).

Drugs

Stock solutions of amphotericin B (AMB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and fluconazole (FLC; Pfizer, São Paulo, Brazil) were prepared according to document M27-A3 (CLSI, 2012). Prometazine (PMZ; Sanofi Aventis, SP, Brazil) was diluted in sterile distilled water. Serial two-fold dilutions of the drugs were performed in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, MO, United States), buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS; Sigma-Aldrich, MO, USA).

Antifungal susceptibility testing for planktonic cells

Susceptibility testing of *Trichosporon* spp. isolates (n=12) to PMZ and antifungal drugs was determined by the microdilution method (CLSI, 2008). After growth on PDA at 35°C for 48h, cell suspensions were prepared in sterile saline solution until they reached turbidity of 0.5 on the McFarland scale. Afterwards, suspensions were diluted in RPMI 1640 to obtain an inoculum of nearly $0.5\text{--}2.5 \times 10^3$ cells/ml. Drugs were tested at concentrations ranging from 0.0625 to 16 µg/ml for AMB, 0.125 to 64 µg/ml for FLC, and 0.5 to 256 µg/ml for PMZ. A total of 100 µl of each fungal suspension was transferred to 96-well microdilution plates containing RPMI supplemented with AMB, FLC or PMZ and incubated at 35 °C for 48 h. MIC values of AMB and FLC were determined as 100% and 50% of fungal growth reduction (CLSI, 2008), respectively, and MIC values of PMZ was defined as the lowest concentrations able to inhibit fungal growth completely (Cordeiro *et al.*, 2020). Tests were performed in duplicate in three independent experiments. *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as quality controls for susceptibility assays (CLSI, 2008).

Interaction between PMZ and antifungals in planktonic cells

The interaction between PMZ and antifungals was evaluated against *T. asahii* CEMM 05-6-072 (urine) and *T. inkin* CEMM 05-6-074 (urine) in a microdilution assay (Cordeiro *et al.*, 2020).

Serial concentrations of PMZ were tested in combinations with FLC (0.0156 to 8 µg/ml) or AMB (0.0078 to 4 µg/ml). Inhibitory concentrations (MIC_{syn}) were defined as the lowest concentrations of each drug in combination capable of inhibiting 100% or 50% fungal growth when compared with drug-free control for AMB-PMZ or FLC-PMZ, respectively (Cordeiro *et al.*, 2020). The fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated for each concentration of PMZ combined with the antifungals. Results were determined as synergic when $FICI \leq 0.5$; indifferent when $0.5 < FICI \leq 4$ and antagonic when $FICI > 4$ (Odds, 2003).

Efflux inhibition assay

Efflux inhibition assay was performed as described by Nzakizwanayo *et al.* (2017) with adaptations. *T. asahii* CEMM 05-6-072 and *T. inkin* CEMM 05-6-074 cultures previously grown in BHI broth at 35°C for 24h were transferred to RPMI medium and incubated for additional 24h. Cultures were centrifuged, cell suspensions were prepared in sterile saline until they reached turbidity of 0.5 on the McFarland scale then diluted in RPMI medium to obtain an inoculum of nearly $0.5 - 2.5 \times 10^3$ cells/ml. A total of 100 µl of each fungal suspension was transferred to 96-well microdilution plates containing RPMI supplemented with Ethidium Bromide (EtBr; 10 µg/mL) as an efflux substrate, and sub-MIC levels of PMZ (0.125xMIC and 0.25xMIC). Controls were formed by RPMI medium with EtBr and PMZ; cell suspensions with EtBr substrate; and cell suspensions with PMZ but no EtBr substrate. Plates were incubated in the dark at 37 °C with gentle agitation for 2 h. Fluorescence was measured at 540 nm excitation and 600 nm emission and relative accumulation of EtBr (indicative of efflux inhibition) was calculated as: fluorescence in PMZ-treated cells - fluorescence in background controls. Experiments were conducted in triplicate at two independent experiments.

Biofilm susceptibility testing

Trichosporon spp. biofilms were formed as described by Cordeiro *et al.* (2015). Strains of *T. asahii* (n=5) and *T. inkin* (n=7) were grown on PDA at 35 °C for 48h. Aliquots of 200 µl of each fungal suspension adjusted to 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium were added to flat-bottomed 96-well polystyrene microplates and incubated at 35 °C for 6h (adhesion period) at 80 rpm. After incubation, non-adherent cells were removed by washing with sterile phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20 (PBS-Tween 20). Afterwards, the wells were filled with RPMI medium and incubated at 35 °C for up to 48h (maturation period) at 80 rpm. The effect of PMZ (planktonic MIC and 10xMIC) was evaluated at three different stages of biofilm formation: cell adhesion (6h), development (24h) and maturation (48 h). Metabolic activity of sessile cells was evaluated by the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay (Kumar, Nagarajan and Uchil, 2018); biomass was evaluated by the crystal violet staining (Peeters *et al.*, 2008). All assays were performed in triplicate in two independent tests. AMB and FLC were also included in the test. Biofilms formed in RPMI medium without inhibitors were included as controls for each test condition.

Interaction between PMZ and antifungals against biofilm

The ability of PMZ to enhance the susceptibility of mature *Trichosporon* biofilms to antifungals was also evaluated. Sub-inhibitory PMZ concentration (8 µg/ml) was added to mature biofilms of *T. asahii* CEMM 05-6-072 and *T. inkin* CEMM 05-6-074 and incubated at 35 °C for 24 h. Then supernatants were aspirated, and each well was refilled with sub-inhibitory concentrations of AMB (10 µg/ml) or FLC (40 µg/ml). Plates were incubated for additional 24 h at 35 °C and subsequently evaluated for metabolic activity and biomass as described above. Controls were performed without PMZ. Experiments were conducted in duplicate in two independent tests. Growth controls were formed in RPMI medium without antimicrobials.

Effect of PMZ on *Trichosporon* persister cells formation

To evaluate the effect of PMZ on *Trichosporon* persister cells formation, mature biofilms were washed with sterile PBS-Tween 20, treated with sub-inhibitory PMZ concentration (8 or 16 µg/ml) and incubated at 35°C for 24 h. Subsequently, the wells were washed with sterile PBS-Tween 20, refilled with 200 µl of AMB (100 µg/ml) and incubated at 35°C for additional 24 h. Thereafter, the wells were washed with sterile PBS-Tween 20, scraped with a pipette tip and the cells were resuspended in 100 µl of sterile PBS (Cordeiro *et al.*, 2021). Suspensions were serially diluted, plated on PDA agar and incubated at 35°C for 24 h for viable cell counting (Cordeiro *et al.*, 2021). Cells that survived exposure to 100 µg/mL AMB treatment were considered persister cells (La Fleur *et al.*, 2006). Biofilm growth controls were formed in drug-free RPMI. Persister cells controls were formed as described by Cordeiro *et al.* (2021). All assays were performed in triplicate, at two independent experiments.

Effect of PMZ on quantification of carbohydrates and proteins of *Trichosporon* biofilms

Biofilms were formed on microplates as described above. Mature biofilms were treated with sub-inhibitory PMZ (8 µg/ml) and incubated at 35 °C for 24 h. Then, supernatants were aspirated, and each well was refilled with sub-inhibitory concentrations of AMB (10 µg/ml) or FLC (40 µg/ml). Plates were incubated for additional 24 h at 35 °C, washed with sterile PBS-Tween 20, and stained with 1% calcofluor-white (Sigma-Aldrich, MO, USA) (Clark *et al.*, 2018), 0.1% Congo Red (Sigma-Aldrich, MO, USA) (Bazzini *et al.*, 2011) or 0.1% safranin (Sigma-Aldrich, MO, USA) (Anne-Marie *et al.*, 2014) for carbohydrates, and SYPRO® Ruby (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) (Mohammed *et al.*, 2013) for proteins. Fluorescence readings at 430 nm/510 nm and 465 nm/630 nm were performed on a Cytation 3 equipment (BioTek, VT, United States) for calcofluor-white and SYPRO® Ruby staining, respectively. For Congo Red and safranin, readings were performed in a spectrophotometer (Celer Biotecnologia S/A, Brazil) at 490 and 630 nm, respectively. Controls were performed in RPMI without PMZ and RPMI supplemented with sub-inhibitory PMZ. Experiments

were conducted in duplicate in two independent tests. Growth controls were formed in RPMI medium without antimicrobials.

Morphology and ultrastructure of *Trichosporon* biofilms

Scanning electron microscopy (SEM) and Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Biofilms of *T. asahii* CEMM 05-6-072 and *T. inkin* CEMM 05-6-074 were analyzed by SEM. Biofilms were prepared as described previously on Thermanox™ coverslips (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) (Cordeiro *et al.*, 2015). Mature biofilms treated with PMZ (planktonic MIC and 10xMIC) were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in 0.15 M sodium cacodylate buffer and 0.1% alcian blue stain and incubated at 4 °C overnight. Biofilms were washed twice with sodium cacodylate buffer and dehydrated in ethanol (50, 70, 80, 95, and 100% [twice]; 10 min each) and then dried with hexamethyldisilazane (Polysciences Europe, Eppelheim, Germany). The coverslips were then coated with 10 nm gold (Emitech Q150T) and analyzed with a FEI Inspect S50 scanning electron microscope in high vacuum mode at 15 kV. Captured images were processed with Photoscape, v.3.6.5 (Mooii Tech, Seoul, Republic of Korea) (Di Bonaventura *et al.*, 2006).

Mature biofilms formed on Thermanox™ coverslips with PMZ (planktonic MIC and 10xMIC) were treated with Live/ Dead™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The images were acquired with a series of horizontal (x-y) optical sections throughout the biofilm depth in a confocal microscope Nikon C2+ (Nikon, Japan) at 488 nm wavelength to detect SYTO 9 and at 561 nm to detect propidium iodide. Seven equidistant points were selected from the 3D images for analysis and colorimetric quantification was performed with Z-slicing in ImageJ 1.50i (Collins, 2007). Experiments were conducted in duplicate.

Statistical analysis

Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test was used for parametric data. For data with asymmetry, Wilcoxon's or Friedman's nonparametric

tests followed by Dunn's post-hoc test was applied. P-values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical Analysis was performed using the software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, USA).

RESULTS

PMZ inhibits *Trichosporon* spp. growth

PMZ inhibited *T. asahii* and *T. inkin* planktonic growth. PMZ MICs ranged from 64 to 256 µg/ml for *T. asahii* (geometric mean: 111.43 µg/mL), and from 32 to 128 µg/ml for *T. inkin* strains (geometric mean: 105.00 µg/mL), as shown in Table 1. Regarding antifungal susceptibility, MICs were as follows: AMB, 0.25 to 1.00 µg/ml for *T. asahii* and *T. inkin* (geometric mean: 1.00 µg/mL for both species); FLC, 1.00 to 4.00 µg/ml (geometric mean: 1.74 µg/mL) for *T. asahii*, and 1.00 to 2.00 (geometric mean: 1.64 µg/mL) for *T. inkin*. Antifungal susceptibility results of internal controls were according CLSI guidelines (CLSI, 2008).

Table 1. Susceptibility of *T. asahii* and *T. inkin* planktonic cells to promethazine (PMZ), amphotericin B (AMB) and fluconazole (FLC).

Species	Strain	PMZ	FLC	AMB
		MIC 100	MIC 50	MIC 100
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	64	4	0.5
	CEMM 05-6-073	128	2	0.5
	CEMM 03-1-072	256	2	1
	CEMM 80	128	1	0.25
	CEMM 81	64	1	0.5
Geometric mean		111.43	1.74	1.00
<i>T. inkin</i>	CEMM 01-1-143	128	2	0.5
	CEMM 01-1-144	128	1	0.5
	CEMM 01-1-145	128	2	1
	CEMM 05-6-057	128	2	1
	CEMM 05-6-074	128	2	0.25
	CEMM 05-6-075	32	1	0.5
	CEMM 03-1-073	128	2	0.5
Geometric mean		105.00	1.64	1.00

MIC 100 = 100% inhibition of visible fungal growth; MIC 50 = 50% inhibition of visible fungal growth.

C. krusei ATCC 6258 MICs ranged from 1 to 2 µg/ml for AMB and from 32 to 64 µg/ml for FLC; *C. parapsilosis* ATCC 22019 MICs ranged from 0.5 to 2 µg/ml for AMB and from 1 to 2 µg/ml for FLC.

PMZ reduces the inhibitory concentrations of antifungals

PMZ at sub-inhibitory concentrations was able to reduce MIC values of FLC and AMB; details of drug interactions are shown in Table 2. Synergism ($FICI \leq 0.5$) between PMZ and antifungals were observed for both species.

Table 2. Interactions between promethazine (PMZ) and amphotericin B (AMB) or fluconazole (FLC) against planktonic *T. asahii* CEMM 05-6-072 and *T. inkin* CEMM 05-6-074.

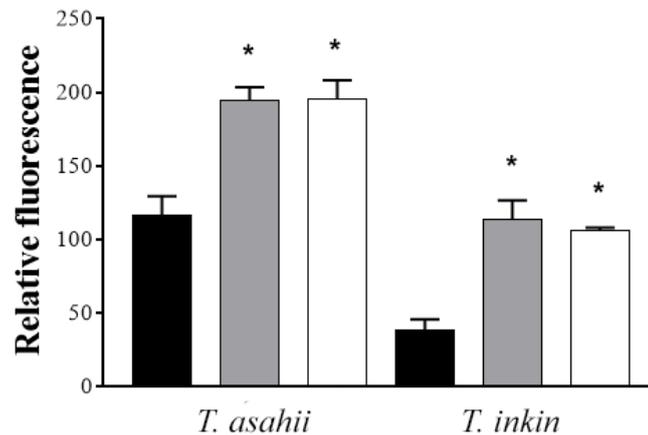
Strains	50% of inhibition			FICI	100% of inhibition			FICI
	PMZ	FLC	PMZ+FLC		PMZ	AMB	PMZ+AMB	
<i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072	16	4	0.062 + 0.5	0.128	64	0.5	0.125 + 0.125	0.252
<i>T. inkin</i> CEMM 05-6-074	32	2	0.125 + 0.25	0.128	128	0.25	0.25 + 0.062	0.252

Combinations formed by PMZ and FLC inhibited fungal growth by 50%; combinations formed by PMZ and AMB inhibit 100% fungal growth when compared with drug-free control. PMZ was able to reduce MICs of both antifungals significantly ($p < 0.05$). Drug concentrations expressed in $\mu\text{g/ml}$. FICI: fractional inhibitory concentration index (FICI synergism ≤ 0.5 ; indifferent $0.5 < FICI \leq 4$; FICI antagonism > 4).

PMZ inhibits efflux in *Trichosporon*

Efflux assays were conducted with sub-inhibitory levels of PMZ, based on MIC assessed previously. At concentration tested ($0.125 \times \text{MIC}$ and $0.25 \times \text{MIC}$) PMZ was able to inhibit putative efflux pumps in *T. asahii* CEMM 05-6-072 and *T. inkin* CEMM 05-6-074 (Fig 1). It was not possible to detect a dose-dependent effect, as both PMZ concentrations elicited a similar increase in cellular fluorescence.

Figure 1. Effect of PMZ on putative efflux pumps in *Trichosporon*. Cells were incubated in RPMI medium supplemented with PMZ (0.25xMIC, gray bars; 0.125xMIC, white bars) and EtBr. Fluorescence intensity relative to cell free controls (black bars) was measured after 4h of exposition to PMZ. Accumulation of EtBr correlates with increase in cellular fluorescence. *Statistically significant differences when compared to drug-free growth controls ($p < 0.05$).

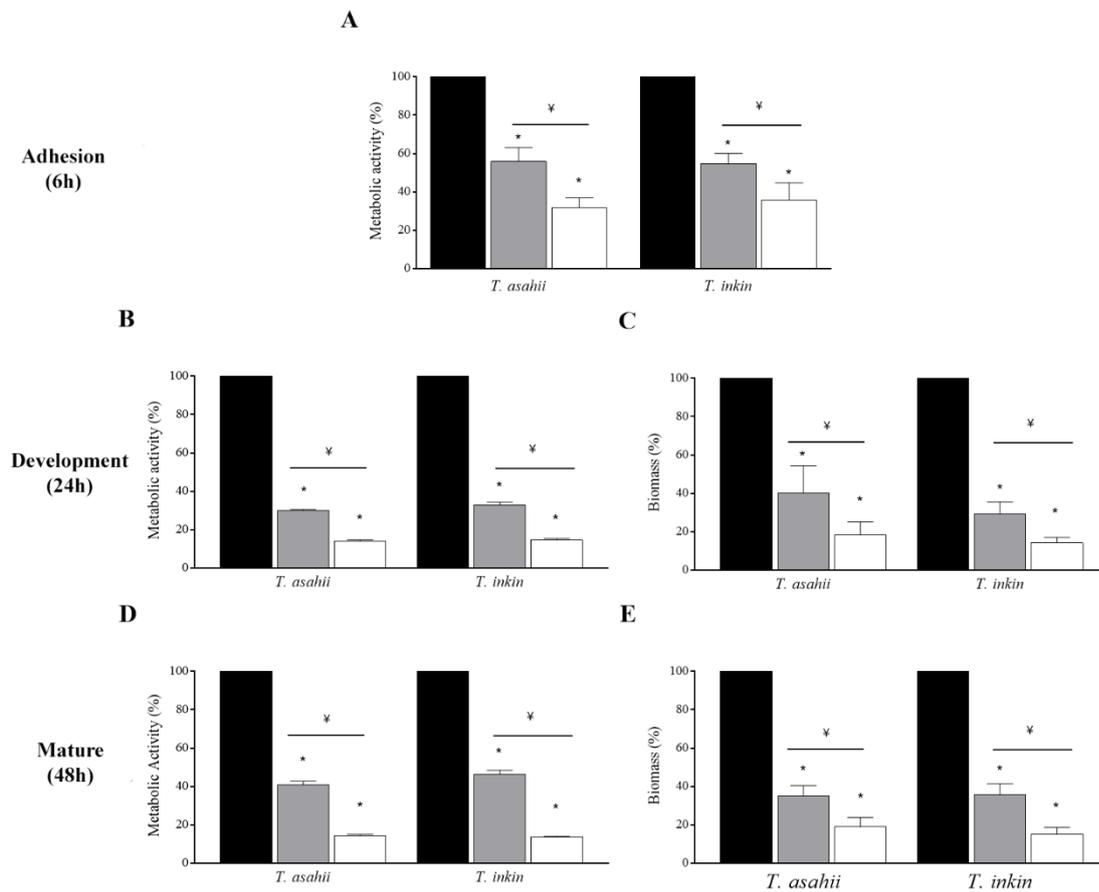


PMZ reduces *Trichosporon* spp. biofilms

During the adhesion phase, PMZ reduced metabolic activity of *Trichosporon* spp. biofilms in 45% or 66% when tested at planktonic MIC or 10xMIC. In general, at the development stage, metabolic activity was reduced in 68% (MIC) and 86% (10xMIC); biomass decreased by 70% (MIC) and 84% (10xMIC). Mature biofilms showed a decrease of 56% (MIC) and 86% (10x MIC) in metabolic activity, as well as a reduction of 65% (MIC) and 83% (10xMIC) in biomass. Details regarding each species are shown in Figure 2.

Figure 2. Effect of PMZ on *Trichosporon* biofilms during adhesion for 6 h (a), development at 24 h (b, c) and mature biofilms at 48 h (d, e). Metabolic activity and total biomass were expressed as relative percentages of absorbance by the MTT reduction test (A, B, C), and crystal violet assay (D, E), respectively. Black bars represent drug free growth controls; gray bars represent biofilms exposed to promethazine (PMZ, MIC) and white bars represent biofilms exposed to PMZ (10xMIC). Values

are shown as mean \pm standard errors of two independent experiments carried out in duplicate. * Statistically significant differences, when compared to drug-free growth controls ($p < 0.05$). ¥ Statistically significant differences ($p < 0.05$) between MIC and 10xMIC groups.



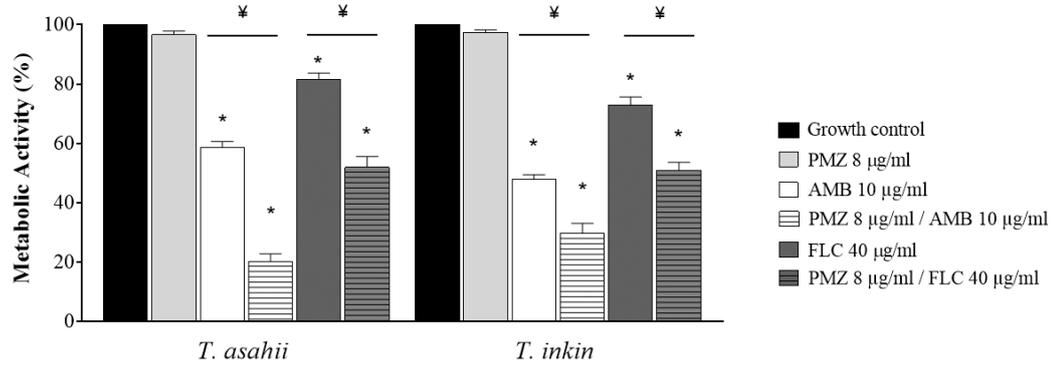
PMZ enhances antifungal susceptibility of mature *Trichosporon* biofilms and interfere in the amount of persister cells

The pre-exposure to sub-inhibitory concentrations of PMZ increased the susceptibility of mature *Trichosporon* biofilms to FLC and AMB (Fig 3). The metabolic activity of *T. asahii* and *T. inkin* mature biofilms to PMZ/AMB combination showed a reduction of 38.33% and 18.40%, respectively (Fig 3A). Furthermore, the PMZ/FLC combination showed a reduction of 29.66% and 22% in metabolic activity of *T. asahii* and *T. inkin* mature biofilms, respectively (Fig 3A). In addition,

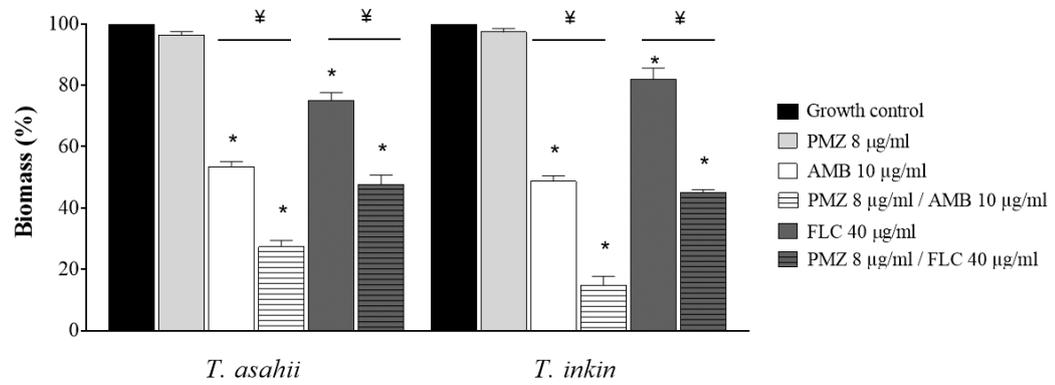
the biomass of *T. asahii* and *T. inkin* mature biofilms to PMZ/AMB combination had a reduction of 26% and 34%, respectively (Fig 3B). Regarding the PMZ/FLC combination showed a reduction of 27.34% and 37% to *T. asahii* and *T. inkin* mature biofilms, respectively (Fig 3B). After exposure to 100 µg/mL AMB persister cells were seen in *T. asahii* CEMM 05-6-072 (3.28%) and *T. inkin* CEMM 05-6-074 (4.03%). Pre-exposure to 16 µg/ml PMZ reduced the amount of persister cells in *T. asahii* (0.39%) and *T. inkin* (0.57%) significantly ($p < 0.05$). However, pre-exposure to 8 µg/ml PMZ did not alter the amount of persister cells in *Trichosporon* spp. biofilms (Fig 3C).

Figure 3. Effect of pre-exposition of sub-inhibitory concentration of PMZ on antifungal susceptibility of mature biofilms (A, B) and persister cells formation (C). Metabolic activity and total biomass were expressed as relative percentages of absorbance by the MTT reduction (A), and crystal violet staining (B), respectively. Values are shown as mean \pm standard error. Survival of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms challenged with 100 µg/mL AMB is expressed as percentage relative to controls grown in drug-free medium (C). Assays were performed in duplicate at two independent experiments. *Statistically significant differences when compared to drug-free growth controls ($p < 0.05$). ¥ Statistically significant differences ($p < 0.05$) between indicated groups.

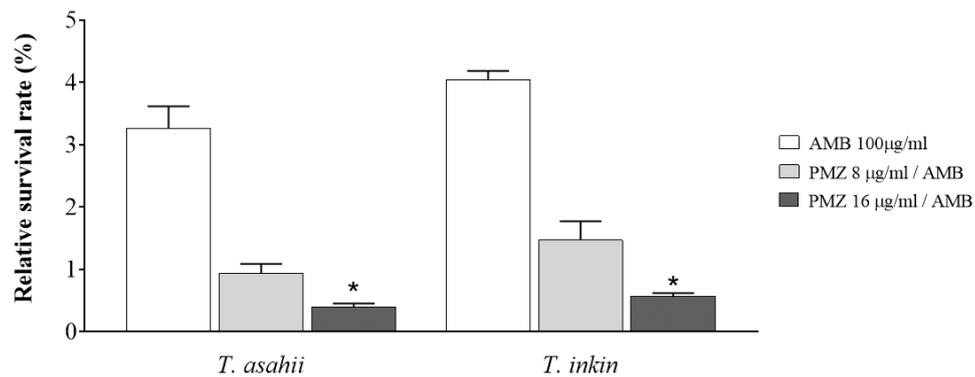
A



B



C

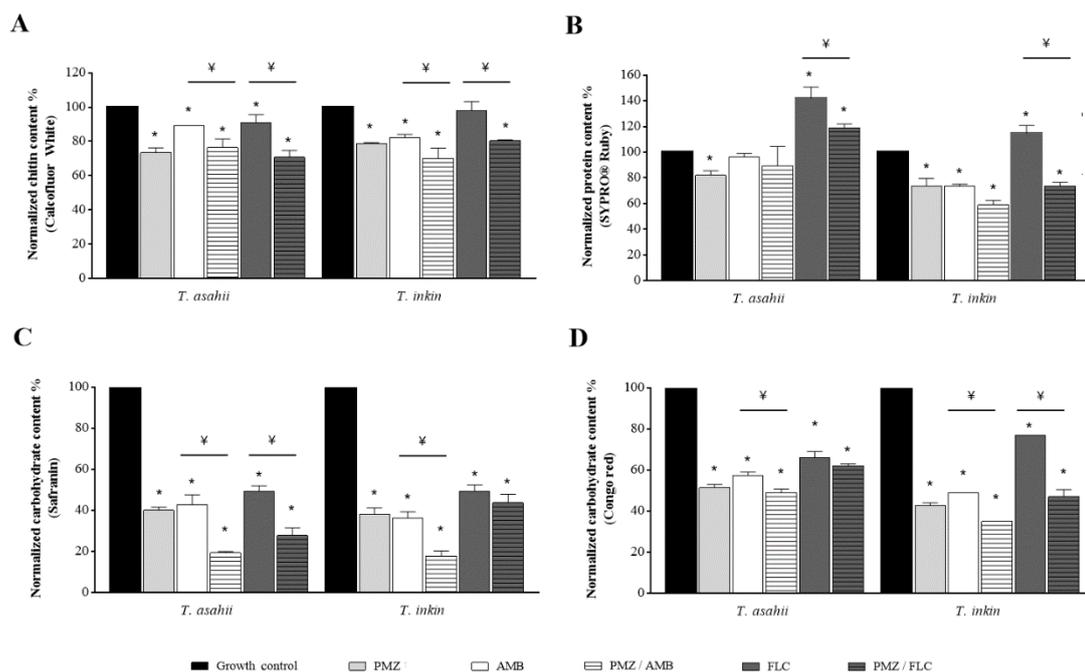


PMZ modifies the quantification of carbohydrates and proteins of *Trichosporon* biofilms

The pre-exposure to sub-inhibitory concentrations of PMZ significantly modified the quantification of carbohydrates and proteins of *Trichosporon* biofilms (Figure 4). In general, the

highest PMZ concentration tested caused more impact on carbohydrate and protein contents of both *T. asahii* and *T. inkin* biofilms.

Figure 4. Effect of sub-inhibitory PMZ and antifungals (AMB and FLC) in quantification of carbohydrates and proteins of *Trichosporon* biofilms. Carbohydrates were expressed as relative percentages of fluorescence (430 nm/510 nm) by calcofluor-white staining (A) and relative percentages of absorbance by safranin (630 nm) (C) and Congo red staining (490 nm) (D). Proteins were expressed as relative percentages of fluorescence (465 nm/630 nm) by SYPRO® Ruby staining (B) Values are shown as mean \pm standard errors of two independent experiments carried out in duplicate. *Statistically significant differences, when compared to drug-free growth controls ($p < 0.05$). ¥ Statistically significant differences ($p < 0.05$) between indicated groups.



PMZ changes the ultrastructure and morphology of *Trichosporon* biofilms

Dense hyphae layers and water channels were observed in *Trichosporon* mature biofilms grown in RPMI in Figure 5 (Fig 5A, 5B) by SEM. PMZ (MIC and 10xMIC) was able to disassemble

these structured communities, remaining thinner and fragmented filaments (Fig 5C, 5D) and collapsed hyphae (Fig 5E, 5F). CLSM confirmed the anti-biofilm potential of PMZ in Figure 6. Dead cells and reduced biomass were seen in mature biofilms treated with PMZ at MIC (Fig 6B, 6E) or 10xMIC (Fig 6C, 6F). PMZ caused significant reduction in biofilm thickness (Fig 6G); fluorescence intensity of PMZ-treated biofilm stained with SYTO9 and propidium iodide revealed increasing cell death (Fig 6H).

Figure 5. SEM images of *T. asahii* CEMM 05-6-072 (A, B) and *T. inkin* CEMM 05-6-074 (C, D) mature biofilms grown in RPMI agar as controls; mature biofilms treated with MIC PMZ (E-H) and 10xMIC PMZ (I-L). Arrows indicate water channels (B, D), disrupted hyphae (F, H) and collapsed hyphae (J, L). Magnification: 1000x and 5.000x.

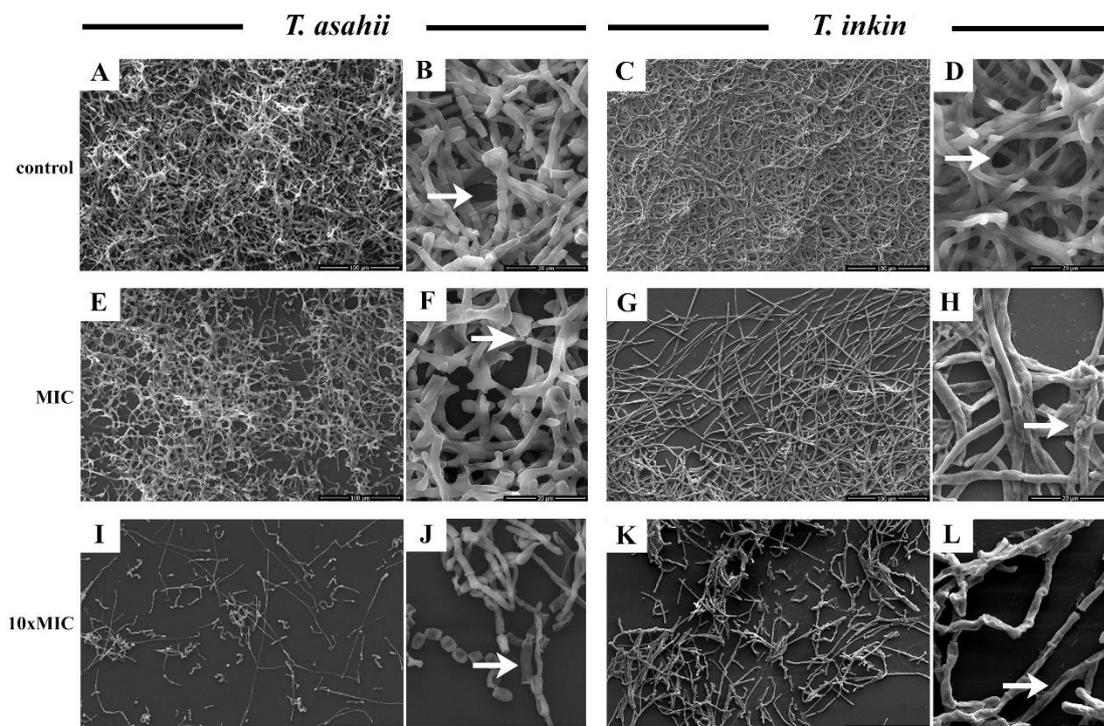
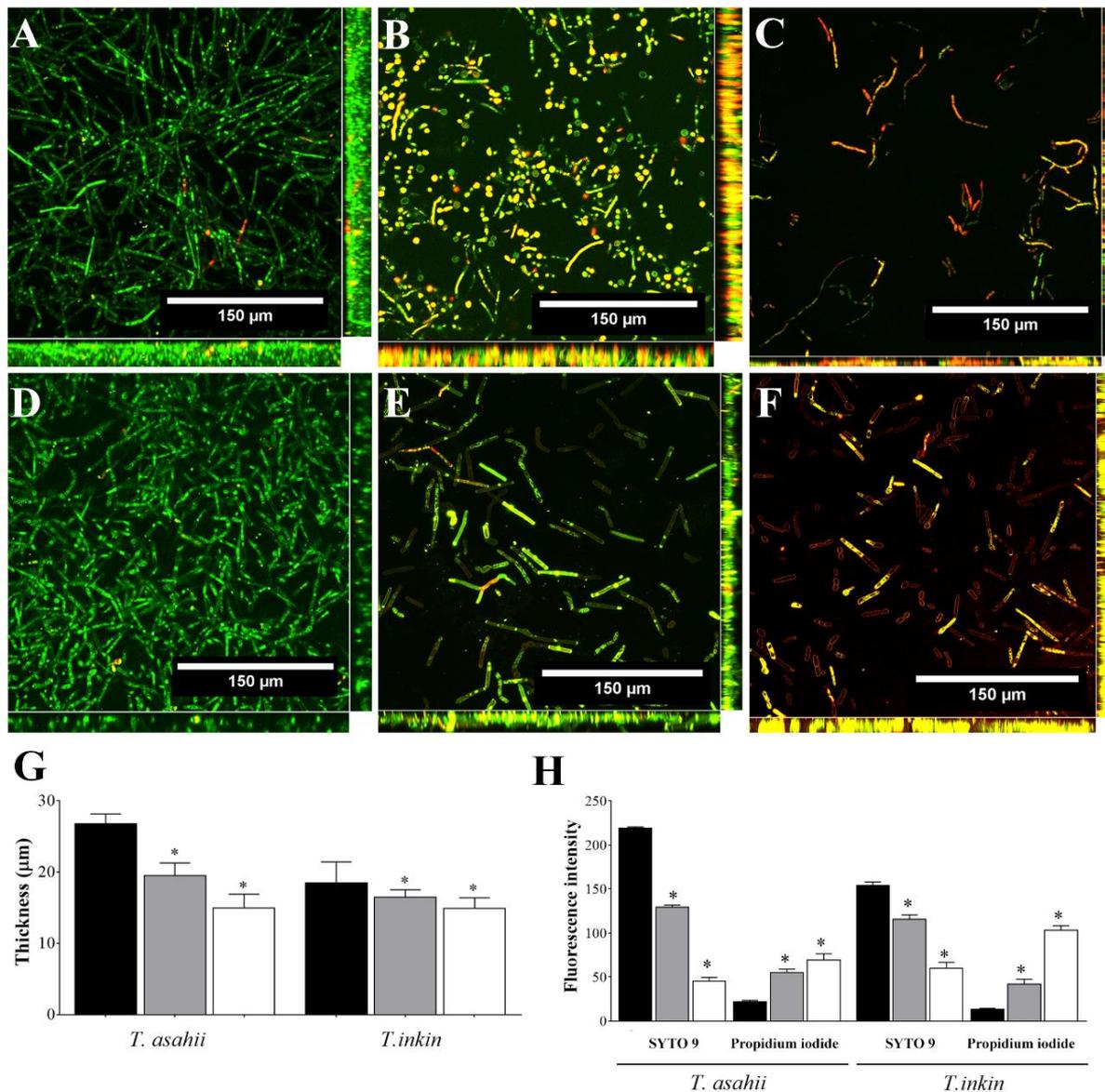


Figure 6. CLSM images of *T. asahii* CEMM 05-6-072 (A-C) and *T. inkin* CEMM 05-6-074 (D-F) mature biofilms grown in RPMI agar as controls; mature biofilms treated with MIC PMZ (B, E) and

10×MIC PMZ (C, F). Thickness (G) and fluorescence intensity (H) of *Trichosporon* mature biofilms (48 h) grown in RPMI medium (black bars), RPMI supplemented with MIC PMZ (gray bars) and RPMI supplemented with 10×MIC PMZ (white bars). The graph represents the colorimetric intensity of live and dead/damaged cells stained with SYTO9 and propidium iodide, respectively. *Statistically significant differences, when compared to drug-free growth control ($p < 0.05$).



DISCUSSION

Increasing of invasive trichosporonosis cases have been described by many authors (Guo et al., 2019; Singh et al., 2019; Rodrigues & Nosanchuk, 2020; Kourt & Roilides, 2022). In this context, *T. asahii* and *T. inkin* stand out for their high virulence and tolerance to antifungals, mainly FLC and AMB (Basu et al., 2015; Padovan et al., 2019). This scenario has stimulated studies focused on the search for therapeutic alternatives for these pathogens and the better understanding of their virulence mechanisms (Cordeiro et al., 2015; Fuentefria et al., 2017; Padovan et al., 2019, Cordeiro et al., 2021).

Promethazine ((RS)-N,N-dimethyl-1-(10H-phenothiazine-10-yl)propan-2-amine) is a low molecular weight drug with lipophilic properties (Gao et al., 2019) and these characteristics may favor its penetration into the biofilm. Recent studies relate the inhibitory potential of PMZ against several fungi due to its inhibitory effect on efflux pumps (Brilhante et al., 2018; Brilhante et al., 2020; Cordeiro et al., 2020). Phenothiazines can also inhibit the binding of calcium to the calcium-binding proteins of eukaryotes (Amaral et al., 2010), which in turn, inhibit many energy-providing enzymes - mainly those that are on or close to the plasmalemma. As a consequence, a significant reduction of plasma membrane functions occurs, including the decrease of ABC transporters (Amaral et al., 2010). This mechanism of action on energy-dependent membrane function may also explain the inhibitory action of phenothiazines on fungal cells (PRECISA DE UMA REFERÊNCIA: AMARAL, ET AL, 2010???)

It is already known that the efflux pump is an important resistance mechanism in fungi (Abbes et al., 2021) and two classes of efflux pumps have been characterized and related to azole resistance: the ATP-binding cassette (ABC proteins) – transporters that use the hydrolysis of ATP as an energy source – and the major facilitator superfamily (MFS) pumps – which use membrane potential to drive efflux and translocate substrates (Prasad & Rawal, 2014). In general, these two superfamilies of transporters account for approximately half of all the genes encoding transporters in fungal genomes and are involved in many cellular processes, such as calcium entry, dimorphic switching, stress tolerance, vesicle transport, virulence factor enzyme activity, capsule synthesis and iron acquisition

(Coleman & Mylonakis, 2009; Prasad & Rawal, 2014; Padovan et al., 2019). These carriers are also directly involved in transporting of substrates, including ions, carbohydrates, lipids, amino acids, and peptides, nucleosides, and other small molecules, showing great relevance to fungal survival (Wang et al., 2020).

Molecular mechanisms of azole resistance in *Trichosporon* spp are still poorly understood. Abbes et al. (2021) demonstrated that the activity of efflux pumps is directly related to FLC resistance in *T. asahii*. A previous study evaluated the correlation between possible mutations in the *ERG11* gene and the development of azole resistance in *T. asahii* strains obtained from patients with invasive trichosporonosis (Kushima et al., 2017). Efflux pump hyperactivity may also play a role as a potential mechanism for the development of FLC resistance among *T. asahii* clinical isolates (Padovan, 2019).

In the present study it was observed that PMZ abolished *in vitro* growth of planktonic cells of *Trichosporon* at concentrations ranging from 32 to 256 µg/ml. Recent studies have shown that PMZ affects growth, morphogenesis, biofilm formation and antifungal resistance of many fungal species, such as *Microsporum canis* (Aneke et al., 2020), *Candida tropicalis* (Brilhante et al., 2018), *Fusarium solani* species complex (Cordeiro et al., 2020) and *Cryptococcus neoformans/ Cryptococcus gattii* complex (Brilhante et al., 2020). In general, PMZ MICs for other pathogenic fungi (Brilhante et al., 2018; Brilhante et al., 2020; Cordeiro et al., 2020) are similar to those found for *Trichosporon* spp., which confirms the broad antifungal activity of this drug.

Furthermore, in this study, subinhibitory concentrations of PMZ increased the susceptibility of *Trichosporon* spp. to AMB and FLC, showing synergism with these drugs. Synergism between PMZ and antifungals has already been described for other fungal species. Cordeiro et al. (2020) showed synergistic interactions of PMZ with AMB or voriconazole against *Fusarium solani* species complex. Brilhante et al. (2018) observed synergism between PMZ and azoles against azole-resistant *C. tropicalis*. According to Latta et al. (2006), PMZ enhanced susceptibility to azoles in *Malassezia furfur* and *M. pachydermatis*. Taken together, these results reinforce the synergic potential between PMZ and antifungals against fungal pathogens.

The ability to form biofilms is an important virulence factor in *Trichosporon* (Iturrieta-González et al., 2014; Montoya et al., 2018). The adhesion of fungal cells to intracorporeal medical devices and the formation of biofilms contribute to the pathogeny of invasive trichosporonosis and lead to worsening of the clinical condition of patients due to the difficulty of action of antifungals (Montoya et al., 2018). In the present study, it was shown that PMZ affected adhesion, development and maturation of *Trichosporon* biofilms and also improved the inhibitory effect of AMB and FLC, which suggest the importance of efflux pumps to formation and maintenance of *Trichosporon* biofilms as well as for antifungal response in such sessile communities.

In the present study, we showed that *Trichosporon* biofilms pre-exposed to sub-inhibitory concentrations of PMZ produced less persister cells than unexposed biofilms. Several mechanisms of antifungal tolerance in these cells have been suggested, including expression of heat shock proteins (Li et al., 2015), protection against reactive oxygen species (Li et al., 2015), as well as expression of efflux pumps (Cohen, Lobritz & Collins, 2013). Persister cell have been associated to recalcitrant infections (Defraigne et al., 2018; Wainwright et al., 2021) and, therefore, the search of anti-persister molecules should be performed.

In general, it was also observed that biofilms pre-exposed to PMZ and then treated with AMB or FLC had a substantial reduction in carbohydrates and proteins. Sessile cells treated with FLC alone showed an increase in protein content, which may be related to the higher expression of efflux pumps or heat shock proteins in cells subjected to pharmacological stress (Li et al., 2015, 2017). Changes in the ultrastructure of *Trichosporon* biofilms treated with PMZ were also detected in this study. PMZ induced a disruption of these structured communities, which remaining thinner, with fragmented filaments and collapsed hyphae. These findings suggest the importance of efflux pumps in the cell functioning and reinforce the potential of this target on the development of new antifungal molecules.

The present study proved the inhibitory effect of PMZ on *Trichosporon* cells. The results suggest that the inhibition of efflux pumps may be a promising strategy to overcome antifungal tolerance in *Trichosporon* spp. Further studies should evaluate the inhibition of efflux pumps as a

promising strategy for the development of alternative antifungal and anti-biofilm molecules. The design of such molecules could help to control invasive fungal infections such as trichosporonosis.

REFERENCES

- Abbes, S., Sellami, H., Neji, S., Trabelsi, H., Makni, F. and Ayadi, A. (2021) Implication of efflux pumps and ERG11 genes in resistance of clinical *Trichosporon asahii* isolates to fluconazole. *J Med Microbiol.* **70**, 001236.
- AL-DHAHERI, R.S.; DOUGLAS, L.J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, p. 1884 –1887. 2008.
- Amaral L, Martins A, Molnar J, Kristiansen JE, Martins M, Viveiros M, Rodrigues L, Spengler G, Couto I, Ramos J, Dastidar S, Fanning S, McCusker M, Pages JM. Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDRTB. *In Vivo*. 2010 Jul-Aug;24(4):409-24.
- Aneke, C., Rhimi, W., Otranto, D. and Cafarchia, C. (2020) Synergistic Effects of Efflux Pump Modulators on the Azole Antifungal Susceptibility of *Microsporium canis*. *Mycopathologia.* **185**, 279–288.
- Anne-Marie, L., Johnson, J. R., and Dunny, G. M. (2014). A widely used in vitro biofilm assay has questionable clinical significance for enterococcal endocarditis. *PLoS One* 9:e107282.
- Arastehfar, A., Júnior, J.N. de A., Perlin, D.S., Ilkit, M., Boekhout, T. and Colombo, A.L. (2021) Multidrug-resistant *Trichosporon* species: underestimated fungal pathogens posing imminent

threats in clinical settings. <https://doi.org/101080/1040841X20211921695>.

Basu, S., et al., 2015. Multidrug-resistant Trichosporon: an unusual fungal sepsis in preterm neonates. *Pathog Glob Health*. 109, 202-6.

Bazzini, S., Udine, C., Sass, A., Pasca, M. R., Longo, F., Emiliani, G., et al. (2011). Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*. *PLoS One* 6:e18902. doi: 10.1371/journal.pone.0018902

Brilhante, R.S.N., Oliveira, J.S., Evangelista, A.J.J., Pereira, V.S., Alencar, L.P., Castelo-Branco, D. de S.C.M., Câmara, L.M.C., Lima-Neto, R.G., Cordeiro, R.A., Sidrim, J.J.C. and Rocha, M.F.G. (2018) In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. *Med Mycol*. **56**, 1012–1022.

Brilhante RSN, Gotay WJP, Pereira VS, de Oliveira JS, Pereira-Neto WA, Castelo-Branco DSCM, Cordeiro RA, Sidrim JJC, Rocha MFG. (2020) Antifungal activity of promethazine and chlorpromazine against planktonic cells and biofilms of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* complex species. *Med Mycol*. **1**;58(7):906-912.

Cantisani, C., Ricci, S., Grieco, T., Paolino, G., Faina, V., Silvestri, E. and Calvieri, S. (2013) Topical Promethazine Side Effects: Our Experience and Review of the Literature. *Biomed Res Int*.

Clark, H. L., Minns, M. S., Sun, Y., de Jesus, T., Ghannoum, M. G., and Pearlman, E. (2018). Atovaquone impairs growth of *Aspergillus* and *Fusarium* keratitis isolates by modulating mitochondrial function and zinc homeostasis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 59, 1589–1598.

CLSI (2008) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition*. *Clin Lab Stand Inst*. M27-A3 edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2012) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, fourth informational supplement*. *Clin Lab Stand Institute, Wayne, PA*. M27-S4 edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host*

Microbe (2013)13:632-642.

Coleman JJ, Mylonakis E. Efflux in fungi: la pièce de résistance. *PLoS Pathog.* 2009 Jun;5(6):e1000486. doi: 10.1371/journal.ppat.1000486. Epub 2009 Jun 26. PMID: 19557154; PMCID: PMC2695561.

Collins, T.J. (2007) ImageJ for microscopy. *Biotechniques.* **43**, 25–30.

Colombo, A. L., Padovan, A. C. B., Chaves G. M. (2011) Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. *Clinical Microbiology Reviews.* **24**, 682–700.

Cordeiro, R. de A., Serpa, R., Alexandre, C.F.U., Marques, F.J. de F., de Melo, C.V.S., Franco, J. da S., Evangelista, A.J. de J., de Camargo, Z.P., Brilhante, R.S.N. and Rocha, M.F.G. (2015) *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. *J Med Microbiol.* **64**, 1277–1286.

Cordeiro, R. de A., Serpa, R., Mendes, P.B.L., Evangelista, A.J. de J., Andrade, A.R.C., Franco, J. da S., Pereira, V. dos S., Alencar, L.P. de, Oliveira, J.S. de and Camargo, Z.P. de (2017) The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. *Biofouling.* **33**, 640–650.

Cordeiro, R., Portela, F., Pereira, L., de Andrade, A., de Sousa, J., Aguiar, A., Pergentino, M., de Sales, G., de Oliveira, J., Medrano, D., Brilhante, R., Rocha, M., Castelo-Branco, D. and Sidrim, J. (2020) Efflux pump inhibition controls growth and enhances antifungal susceptibility of *Fusarium solani* species complex. *Future Microbiol.* **15**, 9–20.

Cordeiro RA, Aguiar ALR, da Silva BN, Pereira LMG, Portela FVM, de Camargo ZP, de Lima-Neto RG, Castelo-Branco DSCM, Rocha MFG, Sidrim JJC. *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Apr 22;11:645812. doi: 10.3389/fcimb.2021.645812. PMID: 33968802; PMCID: PMC8100310.

Defraigne V, Fauvart M, Michiels J. (2018) Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resist Updat.* **38**:12-26.

- Del Pozo, J. (2018) Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **16**, 51–65.
- Di Bonaventura, G., Pompilio, A., Picciani, C., Iezzi, M., D'Antonio, D. and Piccolomini, R. (2006) Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**, 3269–3276.
- Donnert, M., Elsheikh, S., Arce-Rodriguez, A., Pawar, V., Braubach, P., Jonigk, D., Haverich, A., Weiss, S., Müsken, M. and Häussler, S. (2020) Targeting bioenergetics is key to counteracting the drug-tolerant state of biofilm-grown bacteria. *PLoS Pathog.* **16**.
- Elías J, Yáñez M, Pereira TMC, Gil-Longo J, MacDougall DA, Campos-Toimil M. An Update to Calcium Binding Proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1131:183-213. doi: 10.1007/978-3-030-12457-1_8. PMID: 31646511.
- Foster, C. E.; Edwards, M. S.; Brackett, J.; Schady, D. A.; Healy, C. M.; Backer, C. J. Trichosporonosis in Pediatric Patients With a Hematologic Disorder, *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, Volume 7, Issue 3, September 2018, Pages 199–204.
- 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.
- Guo, L.N., Yu, S.Y., Hsueh, P.R., Al-Hatmi, A.M.S., Meis, J.F., Hagen, F., Xiao, M., Wang, H., Barresi, C., Zhou, M.L., Sybren De Hoog, G. and Xu, Y.C. (2019) Invasive infections due to *Trichosporon*: Species distribution, genotyping, and antifungal susceptibilities from a multicenter study in China. *J Clin Microbiol.* **57**.
- Wang SC, Davejan P, Hendargo KJ, Javadi-Razaz I, Chou A, Yee DC, Ghazi F, Lam KJK, Conn AM, Madrigal A, Medrano-Soto A, Saier MH Jr. Expansion of the Major Facilitator Superfamily (MFS) to include novel transporters as well as transmembrane-acting enzymes. *Biochim*

Biophys Acta Biomembr. 2020 Sep 1;1862(9):183277. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183277. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32205149; PMCID: PMC7939043.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J. and Figueras, M.J. (2000) *Atlas of clinical fungi*. 2nd edn. Baarn: The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmiscultures.

Gao S, Zhou X, Lang L, Liu H, Li J, Li H, Wei S, Wang D, Xu Z, Cai H, Zhao Y, Zou W. (2019) Simultaneous Determination of Schisandrin and Promethazine with Its Metabolite in Rat Plasma by HPLC-MS/MS and Its Application to a Pharmacokinetic Study. *Int J Anal Chem.* **9**;2019:3497045.

Iturrieta-González, I.A., Padovan, A.C.B., Bizerra, F.C., Hahn, R.C. and Colombo, A.L. (2014) Multiple Species of *Trichosporon* Produce Biofilms Highly Resistant to Triazoles and Amphotericin B. *PLoS One.* **9**.

Kolaczowski, M., Michalak, K. and Motohashi, N. (2003) Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. *Int J Antimicrob Agents.* **22**, 279–283.

Kourti M, Roilides E. Invasive Trichosporonosis in Neonates and Pediatric Patients with Malignancies or Hematologic Disorders. *Pathogens.* 2022 Feb 12;11(2):242.

Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018 Jun 1;2018(6). PMID: 29858338.

Kushima, H., et al., 2017. A New Amino Acid Substitution at G150S in Lanosterol 14- α Demethylase (Erg11 protein) in Multi-azole-resistant *Trichosporon asahii*. *Med Mycol J.* **58**, E23-E28.

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

Latta R, Puttilli MR, Immediato D, Otranto D, Cafarchia C. (2017) The role of drug efflux pumps in

- Malassezia pachydermatis and Malassezia furfur defence against azoles. *Mycoses*. **60**(3):178-182.
- Li, H., Guo, M., Wang, C., Li, Y., Fernandez, A.M., Ferraro, T.N., Yang, R. and Chen, Y. (2020) Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past 23 years. *Epidemiol Infect.* **148**.
- Li, S.-X., Song, Y.-J., Zhang, L.-L., Shi, J.-P., Ma, Z.-L., Guo, H., Dong, H.-Y., Li, Y.-M. and Zhang, H. (2015) An in vitro and in vivo study on the synergistic effect and mechanism of itraconazole or voriconazole alone and in combination with tetrandrine against *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol.* **64**, 1008–1020.
- Li P, Seneviratne CJ, Alpi E, Vizcaino JA, Jin L. Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of *Candida albicans* biofilm persisters. *Antimicrob Agents Chemother* (2015) 59:6101-6112.
- Li, H., et al., 2017. Integrated transcriptomic analysis of *Trichosporon Asahii* uncovers the core genes and pathways of fluconazole resistance. *Sci Rep.* 7, 17847.
- Mohammed, M. M. A., Nerland, A. H., Al-Haroni, M., and Bakken, V. (2013). Characterization of extracellular polymeric matrix, and treatment of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms with DNase I and proteinase K. *J. Oral Microbiol.* 5:20015.
- Montoya AM, Elizondo-Zertucge M, Treviño-Rangel RJ, Becerril-Gargia M, González GM. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients. *Rev Iberoam Micol* (2018) 35:22-26.
- Nobrega de Almeida J Jr, Moreno L, Francisco EC, Noronha Marques G, Mendes AV, Barberino MG, Colombo AL. *Trichosporon asahii* superinfections in critically ill COVID-19 patients overexposed to antimicrobials and corticosteroids. *Mycoses*. 2021 Aug;64(8):817-822.
- Nzakizwanayo J, Scavone P, Jamshidi S, Hawthorne JA, Pelling H, Dedi C, Salvage JP, Hind CK,

- Guppy FM, Barnes LM, Patel BA, Rahman KM, Sutton MJ, Jones BV. Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. *Sci Rep*. 2017 Sep 22;7(1):12222. doi: 10.1038/s41598-017-12445-w. PMID: 28939900; PMCID: PMC5610337.
- Odds, F.C. (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* **52**, 1.
- Padovan, A.C.B., Rocha, W.P. da S., Toti, A.C. de M., Freitas de Jesus, D.F., Chaves, G.M. and Colombo, A.L. (2019) Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: Triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis. *Fungal Genet Biol.* **133**, 103267.
- Peeters E, Nelis H, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods* 72(2), 157–165 (2008).
- Prasad R, Rawal MK. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Front. Pharmacol.* 5(202), 1–13 (2014).
- Rajendran, R., Mowat, E., McCulloch, E., Lappin, D.F., Jones, B., Lang, S., Majithiya, J.B., Warn, P., Williams, C. and Ramage, G. (2011) Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**, 2092–2097.
- Ramírez, I. and Moncada, D. (2019) Fatal Disseminated Infection by *Trichosporon asahii* Under Voriconazole Therapy in a Patient with Acute Myeloid Leukemia: A Review of Breakthrough Infections by *Trichosporon* spp. *Mycopathol 2019 1852*. **185**, 377–388.
- Rauseo, A.M., Coler-Reilly, A., Larson, L. and Spec, A. (2020) Hope on the Horizon: Novel Fungal Treatments in Development. *Open Forum Infect Dis.* **7**.
- Rodrigues, M.L. and Nosanchuk, J.D. (2020) Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLoS Negl Trop Dis.* **14**.
- Rodriguez-Tudela, J.L., Diaz-Guerra, T.M., Mellado, E., Cano, V., Tapia, C., Perkins, A., Gomez-Lopez, A., Rodero, L. and Cuenca-Estrella, M. (2005) Susceptibility Patterns and Molecular Identification of *Trichosporon* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 4026.

- Roquini, D.B., Cogo, R.M., Mengarda, A.C., Mazloun, S.F., Morais, C.S., Xavier, R.P., Salvadori, M.C., Teixeira, F.S., Ferreira, L.E., Pinto, P.L., Morais, T.R. and De Moraes, J. (2019) Promethazine exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden, egg production, hepatomegaly, and splenomegaly in a schistosomiasis animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* **63**.
- Sidrim JJ, Vasconcelos DC, Riello GB et al. (2017) Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. *Biofouling* **33**(1), 88–97.
- Silva, S., Rodrigues, C.F., Araújo, D., Rodrigues, M.E. and Henriques, M. (2017) *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *J Fungi* 2017, Vol 3, Page 3, 8.
- Singh, S., Capoor, M.R., Varshney, S., Gupta, D.K., Verma, P.K., Ramesh, V. (2019) Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Infections Caused by *Trichosporon* Species: An Emerging Non-*Candida* and Non-*Cryptococcus* Yeast Worldwide. *Indian J Med Microbiol.* **37**, 536-541.