

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA DE DOENÇAS INFECCIOSAS

IARA BASTOS DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE FENÓTIPOS ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE
ISOLADOS CLÍNICOS DA FAMÍLIA *Trichosporonaceae***

Rio de Janeiro

2020

IARA BASTOS DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE FENÓTIPOS ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE
ISOLADOS CLÍNICOS DA FAMÍLIA *Trichosporonaceae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Rodrigo de Almeida Paes
Dr. Fábio Brito dos Santos

Rio de Janeiro

2020

Andrade, Iara Bastos de .

Avaliação comparativa de fenótipos associados à virulência de isolados clínicos da família *Trichosporonaceae* / Iara Bastos de Andrade. - Rio de Janeiro, 2020.

99 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2020.

Orientador: Rodrigo Almeida Paes.

Co-orientador: Fábio Brito dos Santos.

Bibliografia: f. 76-87

1. Trichosporon. 2. Plasticidade metabólica. 3. Melanina. 4. Virulência. I. Título.

IARA BASTOS DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE FENÓTIPOS ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE
ISOLADOS CLÍNICOS DA FAMÍLIA *Trichosporonaceae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Rodrigo de Almeida Paes
Dr. Fábio Brito dos Santos

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Luciana Trilles (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Susana Frases Carvajal

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho

Prof^a. Dr^a. Alba Regina de Magalhães (Revisora e Suplente)

A Deus e minha mãe, Luciana Bastos

Por serem meu alicerce e fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar comigo em todos os momentos e permitir que eu conclua mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais, Luciana Bastos e José Luiz por serem minha inspiração e me apoiarem em todas as decisões. Aos meus irmãos lasmin Bastos e Halisson Bastos. Vocês quatro são minha maior riqueza e essa conquista é por vocês.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo de Almeida Paes, obrigada pela confiança, ensinamentos e disponibilidade. Sempre disposto a ajudar e sanar minhas dúvidas e dificuldades.

Ao meu coorientador Dr. Fábio Brito dos Santos, por ter me ajudado nos momentos em que mais precisei. Sou grata pela ajuda e amizade em que criamos ao longo desses anos.

As queridas amigas MSc. Rowena Alves e Dr^a Maria Helena, por me ajudarem e ensinarem desde o período da graduação. Agradeço pelos ensinamentos e carinho em nosso convívio diário.

A Dr^a. Susana Frases e MSc. Glauber Araújo por terem me ajudado a realizar alguns experimentos e terem me recebido tão bem em seu laboratório. Agradeço pela ajuda e sugestões valiosas.

A Alessandra Leal por ter cedido às cepas provenientes do INCA. Sua contribuição foi fundamental para a execução deste projeto.

A Dr^a. Luciana Trilles por ter me acompanhado nos seminários e ter contribuído com ótimas sugestões.

A Dr^a. Alba Regina pela contribuição e ter aceitado realizar a revisão deste trabalho.

Aos meus amigos do mestrado Ingrid, Anna e Caio por tornarem as disciplinas menos desgastantes e pela amizade.

A todos os estagiários que passaram pelo Diagnóstico Micológico e de alguma forma contribuíram para execução do projeto, Juliana Vitória, Jonas, Marcos, Marcelly, Gabi, Ju, Ana, Bia, Jéssica e Milena. Obrigada por toda ajuda e por terem tornado os meus dias mais felizes.

A todos da equipe do Imunodiagnóstico, por terem cedido espaço e equipamentos para execução de vários experimentos, agradeço em especial ao Dr. Marcos Abreu e Dr. Fernando Almeida por terem me ajudado e ensinado tanto durante esses anos.

Ao setor de Micologia Ambiental por todos os equipamentos e materiais que foram cedidos para execução deste projeto.

Aos queridos amigos Gilberto e Mônica por serem tão solícitos e sempre dispostos a ajudar no preparo de meios de cultura e autoclave de materiais.

A todos do programa de pós-graduação, em especial Priscila Sá por sempre estar disposta a ajudar na resolução dos nossos problemas.

A minha madrinha Valesca por ter sido uma grande incentivadora e sempre esteve ao meu lado, disposta a ajudar, nos momentos em que precisei.

Ao meu namorado Lucas por ser meu maior incentivador, em todos os aspectos da minha vida, esteve comigo nos momentos de maior estresse. Obrigada por me mostrar que iria dar tudo certo e o quanto eu sou capaz.

Aos meus avós, Jorge e Luiza, que sempre estiveram comigo. Espero que ao longo de minha vida, eu possa dar muito orgulho a vocês dois.

As minhas amigas que sempre me apoiaram e incentivaram. Obrigada por serem tão especiais em minha vida e terem sonhado junto comigo, Thamara, Thathy e Louise.

A Fiocruz, FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro concedido.

E a todos que de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, fica aqui o meu muito obrigada.

ANDRADE, I. B. **Avaliação comparativa de fenótipos associados à virulência de isolados clínicos da Família *Trichosporonaceae***. 2020. 99f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2020.

RESUMO

A Família *Trichosporonaceae* compreende um grande número de basidiomicetos leveduriformes que estão amplamente distribuídos na natureza. Algumas dessas espécies, em especial *Trichosporon asahii*, *Trichosporon asteroides* e *Trichosporon inkin*, possuem a capacidade de causar infecções em humanos. A habilidade das espécies da Família *Trichosporonaceae* em causar infecções invasivas está relacionada a uma série de fatores de virulência apresentados por elas, os quais são a produção de enzimas líticas, formação de biofilme, resistência a agentes oxidantes, plasticidade metabólica, mudanças fenotípicas e a presença de determinadas moléculas na parede celular do fungo. Enquanto os três primeiros fatores são bastante descritos na literatura científica, os demais são pouco estudados em isolados clínicos. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os diferentes fenótipos de virulência de isolados clínicos da Família *Trichosporonaceae*. Foram incluídos 79 isolados clínicos identificados fenotipicamente como *Trichosporon* spp. e identificados à nível de espécie molecularmente através do sequenciamento da subunidade D1/D2 da região 28S do DNA ribossomal. A plasticidade metabólica foi avaliada através do crescimento do fungo utilizando lactato e N-acetilglicosamina. Curvas de crescimento dos isolados frente a essas duas fontes de carbono foram construídas utilizando espectrofotometria e comparadas com o crescimento do fungo na presença de glicose. Mudanças fenotípicas foram avaliadas através da observação e contagem de colônias com morfologia rapidamente alterada em comparação com a colônia mãe após repique e incubação a 37 °C. As moléculas associadas à parede celular analisadas foram melanina e glucuronoxilomanana. A produção de melanina foi analisada espectrofotometricamente após crescimento do fungo em meio de cultura contendo L-dihidroxifenilalanina. A quantificação de carboidratos secretados foi avaliada utilizando a metodologia de dosagem pelo método de ácido-sulfúrico e fenol em microplacas. A espécie predominante foi *T. asahii* (n=65), seguida de *T. inkin* (n=4), *Apiotrichum montevidense* (n=3), *Trichosporon japonicum* (n = 2), *Trichosporon faecale* (n=2), *Cutaneotrichosporon debeurmannianum* (n=1), *Trichosporon ovoides* (n=1) e *Cutaneotrichosporon arboriformis* (n=1). Os isolados de *T. asahii* tiveram melhor crescimento durante os 7 dias em lactato e N-acetilglicosamina. Quanto ao crescimento em glicose, *T. asahii* cresceu melhor durante as primeiras 72 horas. Somente *T. asahii*, *T. inkin* e *T. japonicum* apresentaram mudanças fenotípicas. Todos os isolados foram produtores de melanina e glucuronoxilomanana, sem diferenças estatisticamente significativas entre as espécies. Esses resultados permitem ampliar os conhecimentos relativos à virulência da Família *Trichosporonaceae*, conseqüentemente expandindo o entendimento dos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro e suas implicações na tricosporonose invasiva.

Palavras-chave: *Trichosporon*; plasticidade metabólica; melanina; virulência

ANDRADE, I. B. **Comparative evaluation of phenotypes associated with virulence of clinical isolates of the *Trichosporonaceae* Family**. 2020. 99f. Dissertation (Master's Degree in Clinical Research in Infectious Diseases) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2020.

ABSTRACT

The *Trichosporonaceae* family comprises a large number of yeast-like basidiomycetes that are widely distributed in nature. Some of these species, especially *Trichosporon asahii*, *Trichosporon asteroides*, and *Trichosporon inkin*, have the ability to cause infections in humans. The ability of *Trichosporonaceae* species to cause invasive infections is related to a series of virulence factors presented by them, which are the production of lytic enzymes, biofilm formation, resistance to oxidizing agents, metabolic plasticity, phenotypic switching, and the presence of certain molecules in the fungal cell wall. While the first three factors are widely described in the scientific literature, the others are poorly studied in clinical isolates. Thus, the aim of this study was to evaluate the different virulence phenotypes of drugs of the *Trichosporonaceae* Family. We included 79 clinical isolates phenotypically identified as *Trichosporon spp.* and identified at the species level molecularly by sequencing of the D1/D2 subunit of the 28S region of ribosomal DNA. Metabolic plasticity was evaluated by fungal growth using lactate and N-acetylglucosamine. Growth curves were constructed, using spectrophotometric methodology, in the presence of these two carbon sources and compared with the growth of the fungi in the presence of glucose. Phenotypic switching was evaluated through the observation and counting of rapidly morphology altered colonies compared to the mother colony after subcultures and incubation at 37 °C. The cell wall associated molecules analyzed were melanin and glucuronoxylomannan. Melanin production was analyzed spectrophotometrically after fungus growth in culture medium containing L-dihydroxyphenylalanine. The quantification of secreted carbohydrates was assessed using the dosing methodology using the sulfuric acid and phenol method in microplates. The predominant species was *T. asahii* (n = 65), followed by *T. inkin* (n = 4), *Apiotrichum montevidense* (n = 3), *Trichosporon japonicum* (n = 2), *Trichosporon faecale* (n = 2), *Cutaneotrichosporon debeurmannianum* (n=1), *Trichosporon ovoides* (n=1), and *Cutaneotrichosporon arboriformis* (n = 1). *T. asahii* isolates had better growth during the 7 days on lactate and N-acetylglucosamine. As for glucose, *T. asahii* had better growth during the first 72 hours. Only *T. asahii*, *T. inkin*, and *T. japonicum* isolates were able to phenotypic switch. All isolates were melanin and glucuronoxylomannan producers, without statistically significant differences between species. The results of this study expand the knowledge regarding the virulence of members of the *Trichosporonaceae* family, consequently expanding the understanding of the pathogen-host interaction mechanisms and their implications for invasive tricosporonosis.

Keywords: *Trichosporon*; metabolic plasticity; melanin; virulence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células fúngicas parasitando eixo de cabelo característico de <i>Trichosporon</i> sp.....	17
Figura 2 – Características macro e microscópicas de <i>Trichosporon</i> sp.....	19
Figura 3 – Distribuição geográfica de 185 pacientes com fungemia por <i>Trichosporon</i> durante 4 décadas (1975-2014).....	22
Figura 4 – Principais fatores de virulência da Família <i>Trichosporonaceae</i>	26
Figura 5 – Mudanças na morfologia da colônia de <i>Trichosporon asahii</i>	30
Figura 6 – Estrutura da glucuronoxilomanana de leveduras dos gêneros <i>Cryptococcus</i> e <i>Trichosporon</i>	31
Figura 7 – Análise filogenética molecular pelo método de Neighbor-Joining.....	47
Figura 8 – Crescimento das espécies da Família <i>Trichosporonaceae</i> frente à glicose, lactato e N-acetilglicosamina.....	48
Figura 9 - Crescimento das espécies de <i>Trichosporon asahii</i> e não- <i>asahii</i> frente à glicose, lactato e N-acetilglicosamina.....	50
Figura 10 – Cultura celular apresentando filamentação de <i>Trichosporon asahii</i> em microplaca de 96 poços.....	51
Figura 11 – Morfogênese de isolado de <i>Trichosporon asahii</i> em diferentes fontes de carbono.....	52
Figura 12 – Isolado com mudança fenotípica positiva.....	54
Figura 13 – Características morfológicas das colônias de <i>Trichosporon</i> spp.....	55
Figura 14 – Quantificação de carboidratos secretados por isolados da Família <i>Trichosporonaceae</i>	57
Figura 15 – Correlação do valor da quantificação de carboidratos com titulação do látex em isolados da Família <i>Trichosporonaceae</i>	58
Figura 16 – Produção de melanina por isolados da Família <i>Trichosporonaceae</i>	59

Figura 17 – Quantificação da produção de melanina em isolados da Família <i>Trichosporonaceae</i>	60
Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de isolados de <i>T. não asahii</i> comparadas à cepa de referência <i>Cryptococcus neoformans</i> (H99).....	61
Figura 19 – Potencial zeta de amostras de melanina de isolados da Família <i>Trichosporonaceae</i> e <i>C. neoformans</i>	64
Figura 20 – Condutância das amostras da Família <i>Trichosporonaceae</i> e <i>C. neoformans</i>	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resultado do teste de mudanças fenotípicas para isolados da Família <i>Trichosporonaceae</i>	53
Quadro 2 - Quantidades de colônias apresentados por isolados com mudança fenotípica positiva.....	54
Quadro 3 - Composição dos elementos químicos presente em amostras de melanina da Família <i>Trichosporonaceae</i> e <i>C. neoformans</i>	63

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Similaridade das sequências comparadas às depositadas no NCBI/GenBank.....	89
Apêndice B – Diferentes micromorfologias das espécies <i>Trichosporonaceae</i> em glicose, lactato e N-acetilglicosamina.....	92
Apêndice C - Frequência de cada tipo de colônia de isolados da Família <i>Trichosporonaceae</i>	96

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Carta de dispensa de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do INI.....	99
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - Coleção de culturas tipo Norte Americana (*American Type Culture Collection*)

CBS – (*Fungal Biodiversity Centre or Centraalbureau voor Schimmelcultures*)

D1/D2 – Subunidade maior do rDNA 28S (*Large subunit of the 28S rDNA rRNA gene*)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Deoxi-Nucleotídeo Trifosfato

DO - Densidade Óptica

EDTA - Ácido tetracético etilenodiamino (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

IGS - Espaçador intergênico ribossômico (*Intergenic Spacer 1*)

INCA - Instituto Nacional de Câncer

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

ITS - Região de transcrição interna (*Internal Transcribed Spacer*)

MOPS - Ácido 3 (N-morfolino) propanossulfônico (*3-[N-morpholino] Propanesulfonic Acid*)

NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

PBS - Salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)

PDA - Ágar Batata Dextrose

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

rDNA - Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal

RPMI - Instituto Memorial Rosweell Park (*Roswell Park Memorial Institute*)

SDS - Dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

TBE - Tris borato-EDTA

Tris - Tris (Hidroximetil) Aminometano

YNB - Meio base de nitrogênio para leveduras (*Yeast Nitrogen Base*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 FAMÍLIA <i>Trichosporonaceae</i>	16
1.1.1 Tricosporonose	16
1.1.2 O gênero <i>Trichosporon</i>	18
1.2 HISTÓRICO	19
1.3 TAXONOMIA	20
1.4 EPIDEMIOLOGIA DA TRICOSPORONOSE	20
1.4.1 Importância de <i>Trichosporon asahii</i> nas infecções invasivas	23
1.5 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	23
1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA	25
1.6.1 Atividade enzimática	26
1.6.2 Produção de biofilme	27
1.6.3 Plasticidade metabólica	28
1.6.4 Mudanças fenotípicas	29
1.6.5 Moléculas associadas à parede celular	31
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 ISOLADOS CLÍNICOS	37
4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	37
4.2.1 Extração do DNA	37
4.2.2 Avaliação da integridade e quantificação do DNA	38
4.2.3 Amplificação e sequenciamento da subunidade D1/D2 do 28S rDNA	38
4.3 AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE METABÓLICA	39
4.4 MUDANÇAS FENOTÍPICAS	40
4.5 DETECÇÃO DE CARBOIDRATOS SECRETADOS	41
4.6 ANÁLISE DA MELANINA	42
4.6.1 Quantificação	42
4.6.2 Extração de partículas de melanina	43
4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	43
4.6.4 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de raios X por dispersão em energia (SEM-EDS)	44
4.6.5 Potencial zeta e condutância	44
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45

5 RESULTADOS	46
5.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	46
5.2 PLASTICIDADE METABÓLICA	48
5.3 MUDANÇAS FENOTÍPICAS.....	53
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS SECRETADOS	57
5.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE MELANINA	58
5.5.1 Quantificação de melanina por cepas da Família <i>Trichosporonaceae</i>	58
5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (HRSEM)	60
5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de raios X por dispersão em energia (SEM-EDX)	62
5.5.4 Potencial zeta e condutância	64
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICES	88
ANEXO	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA *Trichosporonaceae*

Em recente trabalho publicado pela CBS (*Fungal Biodiversity Centre*), Liu e colaboradores (2015) reavaliaram a classe dos Tremellomycetes e desta forma a Família *Trichosporonaceae* sofreu alterações taxonômicas. Atualmente esta Família compreende quatro gêneros, que são eles *Cutaneotrichosporon*, *Trichosporon*, *Apiotrichum* e *Vanrija* e 58 espécies.

Algumas espécies que eram pertencentes ao gênero *Trichosporon*, agora fazem parte de outros gêneros da Família *Trichosporonaceae*, como é o caso de *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon dermatis* e *Trichosporon mucoides* (LIU et al., 2015).

Os gêneros *Cutaneotrichosporon*, *Trichosporon* e *Apiotrichum* agrupam as espécies de maior relevância clínica (ESPIRITO SANTO et al., 2019). Entretanto, muitos artigos ainda não foram atualizados com a nova taxonomia da Família *Trichosporonaceae*.

1.1.1 Tricosporonose

Os fungos da Família *Trichosporonaceae* podem causar uma variedade de manifestações clínicas, que vão desde micoses superficiais em pacientes imunocompetentes a quadros sistêmicos normalmente em pacientes imunocomprometidos (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

A principal infecção atribuída a *Trichosporon* spp. é a *pedra* branca, uma micose superficial benigna onde o fungo parasita o exterior dos pelos do corpo, utilizando-os somente como suporte para seu crescimento (Figura 1), sem danificar a matriz pilosa (MARINÉ et al., 2015a). Essa micose pode acometer axila, barba, bigode, área genital, fios de cabelo, entre outros (CHAGAS-NETO; CHAVES; COLOMBO, 2008). *Trichosporon ovoides* e *Trichosporon inkin* são as espécies que normalmente estão associadas como agentes da *pedra* branca (SINGH et al., 2019).

Figura 1 – Células fúngicas parasitando eixo de cabelo característico de *Trichosporon sp.*



Fonte: Cedido gentilmente por Gabriela Machado do setor de Micologia/ Diagnóstico Micológico – INI/ Fiocruz

O modo de transmissão desta micose ainda é desconhecido. O diagnóstico é feito através da análise dos espécimes clínicos, que podem ser pelos/escamas, no microscópio óptico utilizando hidróxido de potássio a 20%, onde são observados artroconídios e blastoconídios, característicos da Família *Trichosporonaceae*, ao redor do pelo e sem invadir o mesmo. Em meio de cultura ágar sabouraud observam-se colônias branco-amareladas, pregueadas e com aparência de cera (DINIZ; SOUZA FILHO, 2005).

Mais recentemente, as espécies da Família *Trichosporonaceae* ganharam notoriedade pelo advento de quadros oportunistas, disseminados e potencialmente fatais em indivíduos imunocomprometidos, especialmente aqueles com neoplasias hematológicas apresentando neutropenia e pacientes debilitados utilizando cateter venoso central (MARINÉ et al., 2015a). Pois as espécies desta Família são capazes de aderir a esses dispositivos e formar biofilme, sendo hábeis em escapar da ação de drogas antifúngicas e do sistema imunológico (MARINÉ et al., 2015b).

Apesar de acometer principalmente pacientes hematológicos, a mesma não se restringe apenas a esse grupo (ALMEIDA-JÚNIOR; HENNEQUIN, 2016). Os fatores de risco de infecções invasivas por *Trichosporon* incluem também o uso de corticóide, hemocromatose e doença renal terminal (HENEBERG; ŘEZÁČ, 2013).

Segundo Almeida-Júnior e Hennequin (2016), 85% dos pacientes com doenças hematológicas estavam neutropênicos no tempo do diagnóstico da

tricosporonose invasiva, apoiando o fato de que os neutrófilos são células essenciais na prevenção da infecção. O rompimento da barreira mucosa devido à mucosite, induzida por quimioterapia, também pode contribuir para a invasão do fungo. Isso, combinado com a modificação da flora digestiva devido às terapias antibióticas anteriores, observados em 58-96% dos casos, pode favorecer a translocação de leveduras do sistema digestivo para os vasos sanguíneos.

Os sintomas dermatológicos da tricosporonose invasiva podem incluir pápulas eritematosas, bolhas, ulcerações ou necrose. Outras características incluem insuficiência renal, infiltrados pulmonares e doença hepática crônica. A apresentação clínica desta infecção se assemelha com os sinais clínicos da candidíase disseminada (GARG et al., 2018). As espécies importantes causadoras da tricosporonose invasiva incluem *T. asahii*, *T. asteroides* e *T. mucoides* (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017). Essa infecção, sem o devido diagnóstico e tratamento, possuem prognóstico desfavorável (ALMEIDA-JÚNIOR; HENNEQUIN, 2016).

1.1.2 O gênero *Trichosporon*

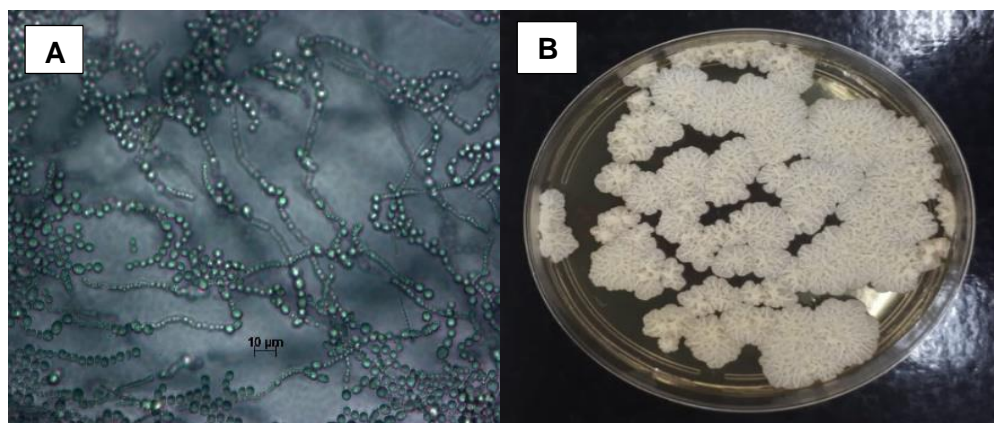
O gênero *Trichosporon* compreende um grande número de basidiomicetos leveduriformes que estão amplamente distribuídos na natureza. As espécies deste gênero podem ser encontradas no solo, ar, água e fazem parte da microbiota como comensais da pele e do trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis (COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011).

Também podem ser encontrados em excretas de pássaros, gado e pombos (MARINÉ et al., 2015b). Estudos mostram que fungos deste gênero são dominantes na superfície corporal e órgãos genitais de panda-gigante (TANG et al., 2007; MA et al., 2017; MA et al., 2019). *Trichosporon* sp. já foi relatado causando tricosporonose invasiva em gatos (RISSI; KIRBY; SANCHEZ 2016), meningite canina (BRYAN et al., 2014) e infecção cutânea em tartaruga (NARDONI et al., 2017).

Este gênero é caracterizado pela capacidade de formar hifas, pseudo hifas, blastoconídios e artroconídios. A cultura de *Trichosporon* sp. em ágar sabouraud dextrose apresenta aspecto de cores variando do branco ao creme (Figura 2) (CHAGAS-NETO; CHAVES; COLOMBO, 2008). Essas colônias possuem superfície irregular composta por fissuras de diferentes direções e profundidades. As espécies

patogênicas são morfologicamente muito semelhantes e podem facilmente ser confundidas (BENTUBO; GAMBALE; FISCHMAN, 2013).

Figura 2 – Características macro e microscópicas de *Trichosporon* sp.



Legenda: A) Microcultivo de *Trichosporon* sp. em meio corn meal agar B) Colônia de *Trichosporon* sp. em meio ágar sabouraud dextrose. Ambos incubado por 72 horas a 37 °C.

Essas leveduras podem ser isoladas em laboratório a partir do cultivo, em meios de cultura específicos, provenientes de materiais clínicos, sendo o *Trichosporon* segundo ou terceiro mais comumente isolado dentre os fungos leveduriformes de origem clínica, na maioria dos laboratórios de diagnóstico. As espécies do gênero *Candida* são as leveduras mais comumente isoladas (PFALLER et al., 2009; ARENDRUP 2013).

As espécies não fermentam carboidratos, mas assimilam glicose, sacarose, maltose, galactose, lactose, trealose e ácido láctico. As espécies deste gênero são urease-positivas (DINIZ; SOUZA FILHO, 2005; BRITO-SANTOS, 2009).

1.2 HISTÓRICO

Em 1865 ocorreu o primeiro relato de um isolado de *Trichosporon* sp., quando o fungo foi isolado a partir de nódulos em fios de cabelo e suas células analisadas no microscópio por Beigel. Contudo, o agente etiológico foi erroneamente classificado como a alga *Pleurococcus beigelli* conforme citado por Figueiredo (2013). De fato, o gênero *Trichosporon* foi criado no ano de 1890 quando o fungo foi isolado a partir de nódulos claros nos pelos do bigode de um europeu, este micro-organismo era semelhante àquele visto por Beigel. A partir deste isolado foram

criados o gênero *Trichosporon* e a espécie *Trichosporon ovoides* Behrend (GUÉHO; HOOG; SMITH, 1992).

A origem do nome deriva do grego *Trichos* que significa cabelo e *poron* que significa esporos. Ao longo de muitos anos, as espécies do gênero *Trichosporon* eram conhecidas apenas como fungos ambientais sapróbios e que ocasionalmente provocavam a micose superficial conhecida como *pedra* branca. O primeiro relato de caso de infecção invasiva por *Trichosporon* ocorreu apenas no ano de 1970 (WATSON; KALLICHURUM, 1970; CHAGAS-NETO; CHAVES; COLOMBO, 2008; FIGUEIREDO 2013; ALMEIDA-JUNIOR 2014).

1.3 TAXONOMIA

Durante mais de um século, a classificação taxonômica do gênero *Trichosporon* foi obscura e praticamente todas as espécies de relevância clínica eram denominadas *T. beigeli*. Com o advento de técnicas de biologia molecular, a reclassificação taxonômica do gênero resultou na distribuição de algumas antigas espécies para outros gêneros fúngicos, bem como na descrição de novas espécies (LIU et al., 2015; LONG; QI-MING, 2015).

Desta forma, algumas espécies pertencentes ao gênero *Trichosporon* foram reclassificadas e atualmente são integrantes em outros gêneros como *Cutaneotrichosporon* e *Apiotrichum* (LIU et al., 2015; LONG; QI-MING, 2015). Os relatos mais recentes reportam 12 espécies no gênero *Trichosporon*, das quais algumas possuem relevância médica, são elas *T. asahii*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. ovoides* e *T. faecale* (ALMEIDA-JUNIOR 2014; FRANCISCO et al., 2019).

1.4 EPIDEMIOLOGIA DA TRICOSPORONOSE

A *pedra* branca possui distribuição mundial, com maior propensão em regiões tropicais e temperadas. Afeta ambos os sexos e qualquer faixa etária. No Brasil, poucos dados se têm sobre esta doença, mas é sabido que a região Norte possui a maior frequência (DINIZ; SOUZA FILHO, 2005). De um modo geral, esta infecção é prevalente em crianças do sexo feminino com menos de nove anos. Acredita-se que a prevalência desta micose seja subestimada devido ao diagnóstico errôneo (FISCHMAN et al., 2014).

No Brasil há relatos na literatura de surtos desta micose em creches, localizada no nordeste do estado de São Paulo. Foi observado nódulos de *pedra* branca em 5,8% das crianças que frequentavam esta creche. Em todos os casos o agente da infecção foi identificado como *T. cutaneum* (ROSELINO et al., 2008).

Ainda no Brasil, em outro estudo teve como objetivo de avaliar a ocorrência de *Trichosporon* causando onicomicose em pacientes que compareceram a um serviço de diagnóstico micológico no Rio de Janeiro, entre janeiro de 2003 e dezembro de 2006. A espécie *T. ovoides* foi isolada em 74,4% dos casos de onicomicose (MAGALHÃES et al., 2016).

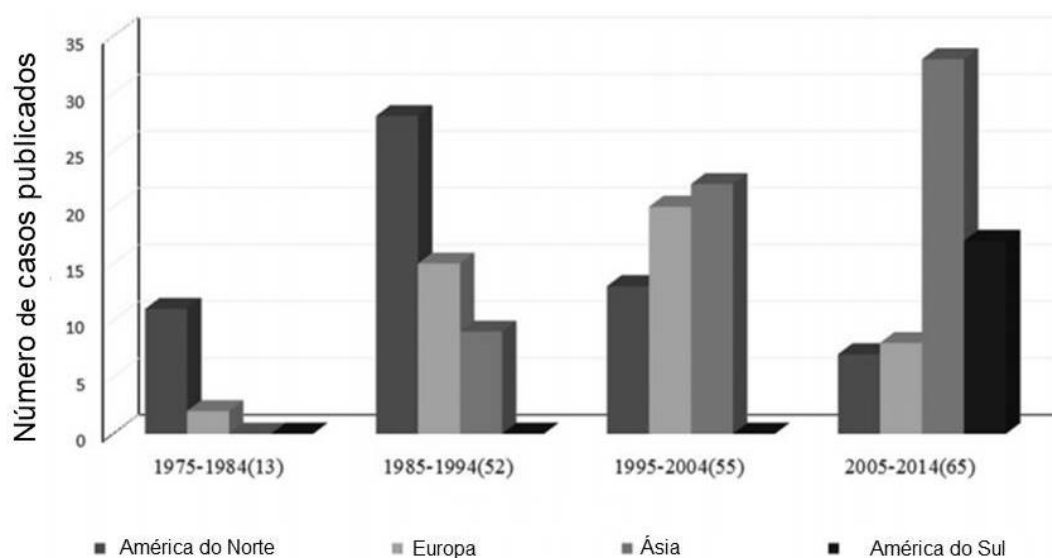
Na África, a incidência de *pedra* branca em espécimes de pelos inguinais foi de 18% na população feminina. As espécies que foram identificadas causando esta infecção superficial foram *T. mucoides*, *T. asahii* e *T. inkin* (THÉRIZOL-FERLY et al., 1994).

Quanto à tricosporonose invasiva foi considerada a segunda causa mais comum de fungemia entre pacientes com doenças hematológicas nos Estados Unidos, na década de 80 (WALSH et al., 1986).

Mais precisamente no Texas, em uma revisão de registros médicos, mostrou que, entre os anos de 1989 e 2002, a incidência geral no centro estudado foi de 8 casos por 100.000 pacientes com câncer. Nos pacientes com neoplasia hematológica esta incidência foi de 81 casos por 100.000 e 3 por 100.000 em pacientes com tumores sólidos (KONTOYIANNIS et al., 2004). Em outro estudo, do mesmo hospital, evidenciou que a incidência geral de tricosporonose invasiva aumentou de 1,8 para 2,35 casos por 10.000 pacientes/dia entre os anos de 1998 a 2010 (CHITASOMBAT et al., 2012).

Em revisão de literatura, Liao et al. (2015) descrevem 185 casos de fungemia por *Trichosporon* relatados na literatura entre 1975 a 2014 em todo o mundo. Foi constatado que o número de casos notificados aumentou no decorrer dos anos, principalmente na última década do estudo. Casos foram relatados em quatro continentes, os quais aumentaram principalmente na América do Norte e Europa durante o período de 1975 a 2004. Para a Ásia e América do Sul o aumento ocorreu no período de 2005 a 2014. De um modo geral, o número de casos aumentou de 13 para 65 quando analisado todos os continentes (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição geográfica de 185 pacientes com fungemia por *Trichosporon* durante 4 décadas (1975-2014)



Fonte: Adaptado de LIAO et al., 2015.

A idade média dos pacientes foi de 47 anos, com prevalência do sexo masculino (66,12%), e uma relação homem/mulher de 1,95: 1. Doenças hematológicas (57,30%), parto prematuro (7,57%), diabetes (4,86%) e tumores (4,32%) foram as condições de base mais comuns. A maioria dos pacientes tinham histórico de neutropenia (60,49%), quimioterapia (58,44%), uso de antimicrobianos (84,05%), terapia antifúngica profilática/ empírica (43,24%) ou uso de cateter venoso central (52,81%) antes ou no início da tricosporonose, e alguns pacientes tinham histórico de uso de corticosteróides (22,70%), admissão à unidade de cuidado intensivo (25,32%) ou co-infecção bacteriana da corrente sanguínea (25%). Junto com sintomas inespecíficos e sistêmicos (como febre e astenia, por exemplo), sintomas de infecção local também foram relatados. A espécie de *T. asahii* foi identificada em 75% dos casos (LIAO et al., 2015).

Outro estudo epidemiológico mostrou que a distribuição geográfica das infecções por espécies de *Trichosporon* varia, mas foi constatado que são predominantemente encontradas em áreas tropicais e temperadas da América do Sul, Oriente Médio, Índia, Sudeste da Ásia, África, Europa, Japão e partes do sudeste dos Estados Unidos da América (EUA) (CASTANO; MADA, 2018).

Na China, em um estudo multicêntrico prospectivo, foram coletados 133 isolados de *Trichosporon* sp. durante 7 anos (2009-2016). Sendo estes 47 centros

(33 hospitais universitários, 7 hospitais militares, 4 hospitais provinciais e 3 hospitais municipais) distribuídos em 15 províncias, 2 regiões autônomas e 4 municípios da China. Destes isolados houve o predomínio de *T. asahii*, seguido de *T. dermatis*, *T. asteroides*, *T. inkin* e *T. dohaense* (GUO et al., 2019).

No Brasil, Francisco e colaboradores (2019) realizaram levantamento das espécies causadoras de tricosporonose em centros médicos brasileiros, entre os anos de 1997 a 2018. As espécies mais isoladas foram, respectivamente, *T. asahii*, *T. inkin*, *T. faecale*, *T. asteroides* e *T. coremiiforme*. Este estudo evidenciou que as espécies não-*asahii* aumentaram com o passar dos anos.

1.4.1 Importância de *Trichosporon asahii* nas infecções invasivas

A espécie *T. asahii* é o principal patógeno associado à tricosporonose invasiva em todo o mundo (PADOVAN et al., 2019). Dependendo da idade do paciente, condições subjacentes, presença de neutropenia e tratamento clínico as taxas de mortalidade da tricosporonose invasiva variam de 30% a 90% (KONTOYIANNIS et al., 2004; WALSH et al., 2004; CHAGAS-NETO et al., 2009; SUZUKI et al., 2010; ALMEIDA JUNIOR E HENNEQUIN, 2016).

Estas altas taxas de mortalidade podem estar relacionadas com resistência intrínseca que isolados de *T. asahii* apresentam a diversos antifúngicos (BASU et al., 2015; PADOVAN et al., 2019). Apesar de ter trabalhos publicados sobre *T. asahii* resistentes (GUO et al., 2011; TSAI et al., 2012; ARABATZIS et al., 2014), são poucos estudos que abordam aspectos clínicos e epidemiológicos de tricosporonose invasiva por *T. asahii* resistentes (PADOVAN et al., 2019).

1.5 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Antifúngicos que são comumente usados para tratar outras infecções fúngicas, como fluconazol e anfotericina B, não são eficientes frente a tricosporonose invasiva. A resistência do fungo a esses fármacos contribui para as elevadas taxas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (MARINÉ et al., 2015a; FRANCISCO et al., 2019; KUBIÇA et al., 2019).

Em uma revisão sistemática sobre o tema revelou que as concentrações mínimas inibitórias da anfotericina B são elevadas, sendo o voriconazol, o

antifúngico mais eficaz (ALMEIDA-JÚNIOR; HENNEQUIN, 2016; RASTOGI et al., 2016).

Em um recente estudo realizado em 24 centros médicos brasileiros foram testados 358 isolados clínicos de *Trichosporon* spp. frente ao fluconazol, voriconazol, posaconazol e anfotericina B. Resultados mostraram que os isolados tiveram altas taxas inibitórias mínimas de anfotericina B, entre os triazóis o fluconazol foi o menos ativo e voriconazol o fármaco mais eficiente (FRANCISCO et al., 2019).

O tratamento de manifestações superficiais por *Trichosporon* spp. normalmente acontece com fármacos antifúngicos tópicos e recomenda-se cortar o pelo da área afetada devido à recorrência frequente da micose (DINIZ; SOUZA FILHO, 2005). Frequentemente em casos de manifestações superficiais afetando o couro cabeludo, é utilizado shampoo com cetoconazol que possui uma boa resposta ao tratamento (BONIFAZ et al., 2019).

Poucos dados sobre a atividade *in vivo* de fármacos antifúngicos contra *Trichosporon* spp. estão disponíveis e a conduta terapêutica em casos de tricosporonose invasiva continua sendo um desafio. Os triazóis parecem ter uma melhor atividade antifúngica que a anfotericina B, enquanto que as equinocandinas não são eficazes. O fluconazol tem menor eficácia *in vitro* e *in vivo* que o voriconazol, o posaconazol ou o isavuconazol (COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011; LIAO et al., 2015; ALMEIDA-JÚNIOR; HENNEQUIN 2016).

Especialistas da Sociedade Européia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas e a Confederação de Micologia Média propuseram recomendações e diretrizes sobre o uso de triazóis para o tratamento de tricosporonose invasiva (CAIRA et al., 2011; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; ARENDRUP et al., 2014). Em pacientes com tricosporonose sistêmica e alterações hematológicas são baixas as taxas de resposta à doença com anfotericina B e, portanto este fármaco não é recomendado para infecções invasivas por *Trichosporon*. O voriconazol é o fármaco mais utilizado porque apresenta boa atividade *in vitro* contra a maioria das espécies de *Trichosporon* e tem sido associado a bons resultados *in vivo* na maioria dos casos. Além do tratamento com voriconazol, a resolução da mielossupressão e remoção de cateteres são outros fatores relacionados que aumentam a sobrevivência dos pacientes (ARENDRUP et al., 2014).

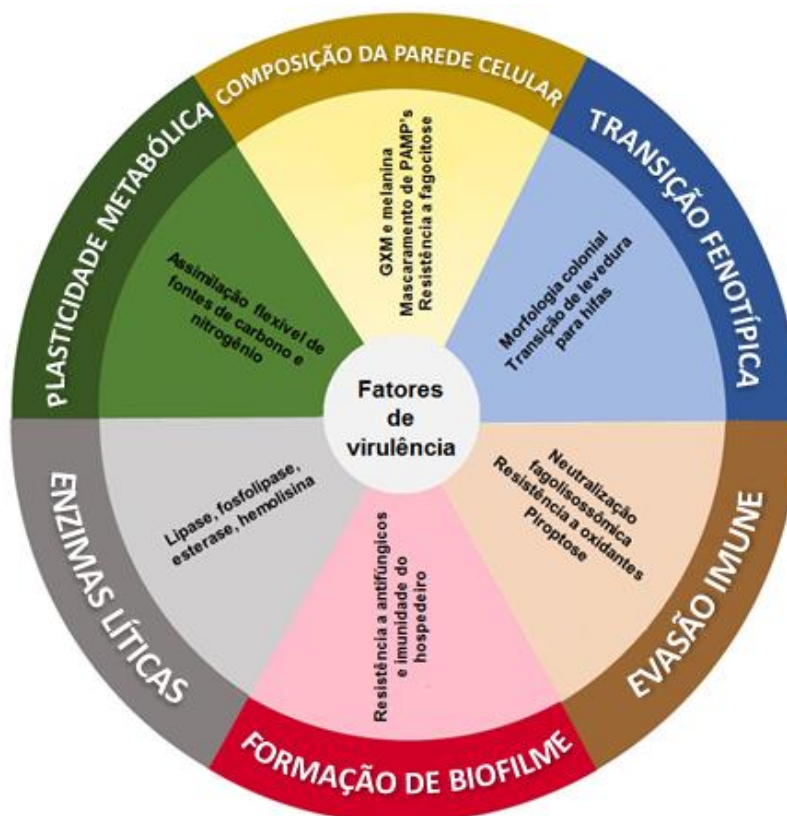
Mesmo com a publicação destas recomendações a seleção da estratégia apropriada de manejo da fungemia por *Trichosporon* spp. permanece difícil, pois são baseadas principalmente em evidências obtidas através de testes de suscetibilidade *in vitro*, modelos animais e relatos de casos ao invés de ensaios clínicos randomizados (LIAO et al., 2015).

1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

A habilidade das espécies da Família *Trichosporonaceae* em causar infecções invasivas está relacionada a uma série de fatores de virulência apresentados por elas, os quais permitem que o fungo deixe de viver em comensalismo e passe a causar doença quando ocorre uma alteração na homeostase do hospedeiro (MARINÉ et al., 2015a).

Uma recente revisão estabelece que os principais fatores de virulência destas espécies são a produção de enzimas extracelulares, formação de biofilme, a resistência aos fármacos antifúngicos e agentes oxidantes, plasticidade metabólica, as mudanças fenotípicas e a presença de determinadas moléculas, tais como melanina e glucuronoxilomanana (GXM) na parede celular do fungo (Figura 4) (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 4 – Principais fatores de virulência da Família *Trichosporonaceae*



Legenda: Mecanismos de virulência usados por espécies de *Trichosporon* spp. como forma de desencadear infecção

Fonte: Adaptado de DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017.

1.6.1 Atividade enzimática

As enzimas extracelulares possuem papel importante dentre os fatores de virulência dos fungos. Estudos realizados em espécies de *Candida* spp. demonstram que essas enzimas possuem função de facilitar a nutrição, aderência, colonização, penetração de tecidos ou células, invasão, disseminação e escape das respostas imunes do hospedeiro (SARDI et al., 2013; ELLS et al., 2014). Além disso, a secreção de algumas enzimas tem a capacidade de regular a resistência a determinados fármacos antifúngicos (SILVA; NERY; DIAS, 2014).

Na Família *Trichosporonaceae*, no que diz respeito a estudos de enzimas extracelulares, destacam-se as esterases, proteases, lipases, fosfolipases, hemolisinas, DNAses, catalase e superóxido dismutases (SUN et al., 2012; BENTUBO; GOMPertz, 2014; MONTOYA et al., 2015; ZHANG et al., 2016; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

As esterases, proteases, lipases, fosfolipases e hemolisinas são importantes enzimas que podem aumentar a patogenicidade dos fungos, visto que possuem a função de quebra de proteínas, lipídeos e ruptura das membranas das células do hospedeiro, dependendo de seus níveis de expressão e da resposta imune do hospedeiro (GHANNOUM 2000; BENTUBO; GOMPERTZ, 2014; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

A produção de DNases foi descrita em espécies de *Trichosporon spp.*. Resultados mostraram que a temperatura e tempo de incubação são fatores determinantes sobre a expressão da atividade desta enzima (BENTUBO; GOMPERTZ 2014).

As superóxido dismutases e catalase possuem papel importante, pois protegem os fungos aos danos dos agentes oxidantes. Em estudos realizados com *T. asahii* mostraram que, isolados clínicos apresentaram maiores atividades destas enzimáticas do que os ambientais. Em outro teste, a expressão enzimática aumentou significativamente após passagem em camundongos, mostrando a importância destas enzimas como fator de virulência (ZHANG et al., 2016).

1.6.2 Produção de biofilme

Alguns micro-organismos têm a capacidade de produzir uma matriz extracelular formada por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular que permite que um conglomerado de células possa aderir em superfícies orgânicas ou inorgânicas, o que é chamado de biofilme (MONTOYA et al., 2018). A formação de biofilme por fungos tem ganhado atenção no cenário clínico principalmente devido à sua capacidade de aumentar a mortalidade em pacientes com fungemia por *Candida spp.* (ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014). Biofilmes nas espécies de *Trichosporon* estão bem caracterizados, morfológicamente e biologicamente, possuindo os mesmos alta capacidade de adesão, alta viabilidade celular e elevada resistência aos fármacos antifúngicos, em especial ao voriconazol, que apresenta boa atividade contra células em suspensão (ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; CONG, L. et al., 2017).

Bonaventura e colaboradores (2006) realizaram uma análise para monitorar a formação de biofilme por *T. asahii* e analisar as características morfológicas das

células aderidas. Durante a fase de maturação (24 a 72 h), a complexidade do biofilme aumentou de uma monocamada para uma estrutura de multicamadas, envolvendo todas as morfologias fúngicas (células de levedura, hifas e pseudo-hifas), resultando em uma estrutura compacta cobrindo toda a superfície do poço.

Devido à associação entre infecções invasivas, utilização de cateteres e outros dispositivos relacionados, a capacidade do micro-organismo de aderir e formar biofilmes pode ter um papel importante no insucesso da terapêutica antifúngica durante a tricomonose (MONTROYA et al., 2018), uma vez que células em biofilme usualmente são mais resistentes aos fármacos antifúngicos do que células em suspensão.

1.6.3 Plasticidade metabólica

A plasticidade metabólica é a capacidade de um organismo em utilizar diferentes fontes de carbono e nitrogênio para o seu crescimento, o que pode conferir uma vantagem adaptativa em ambientes com restrição das fontes nutricionais usuais, o que ocorre com frequência durante a infecção nos tecidos do hospedeiro. *Candida albicans*, por exemplo, consegue se adaptar às mudanças que ocorrem no hospedeiro, onde a disponibilidade de nutrientes é limitada. Estes fungos possuem a capacidade de assimilar diferentes fontes nutricionais a fim de promover interações comensais e patogênicas (MIRAMÓN; LORENZ, 2017).

O trabalho de Miramón e Lorenz (2017) descreve a variedade de açúcares resultante da dieta após o metabolismo do hospedeiro e sua microbiota. Bactérias contribuem para a digestão de carboidratos complexos e produzem uma variedade de metabólitos, como ácidos graxos orgânicos de cadeia curta, por exemplo, lactato, acetato, butirato, propionato. Os fluidos salivares e vaginais também são nutricionalmente complexos e ricos em proteínas e derivados de proteínas. Outras fontes de carbono encontradas no hospedeiro incluem de forma abundante N-acetilglicosamina, um constituinte comum de proteínas glicosiladas do hospedeiro e um componente principal da peptidoglicana da parede celular bacteriana. Lipídios e fosfolipídios encontrados nas membranas celulares também representam um nutriente potencialmente acessível.

Evidências sugerem que *C. albicans* utiliza múltiplas fontes de carbono no hospedeiro. Durante a infecção de órgãos e tecidos, observa-se uma mudança na expressão gênica para a utilização alternativa de carbono. Esta resposta foi observada em vários modelos de infecção, como o epitélio oral humano reconstituído (ZAKIKHANY et al., 2007), macrófagos murinos (LORENZ; BENDER; FINK, 2004) e neutrófilos humanos (RUBIN-BEJERANO et al., 2003; FRADIN et al., 2005).

O lactato é abundante em muitos hospedeiros, e *C. albicans* usa este nutriente como um sinal para promover mudanças na arquitetura de sua parede celular que impactam na resistência desse patógeno a diversos tipos de estresse (ENE et al., 2012). A fagocitose realizada por macrófagos induz a expressão de transportadores de lactato e enzimas metabólicas (LORENZ; BENDER; FINK, 2004; PIEKARSKA et al., 2006) o que sugere que este ácido orgânico possa estar disponível no interior do fagócito.

Ainda no modelo *C. albicans*, a utilização de N-acetilglicosamina, modula o pH extracelular e induz o crescimento de hifas nesta espécie (SINGH; GHOSH, 2001; YAMADA-OKABE et al., 2001). O estudo de Vesely et al. (2017) demonstrou que, além da alteração do pH extracelular, quando esta levedura utiliza N-acetilglicosamina, a ação do fagossoma é bloqueada, inibindo sua maturação e promovendo auto-indução da morfogênese da hifa, o que contribui para que ocorra o escape do macrófago.

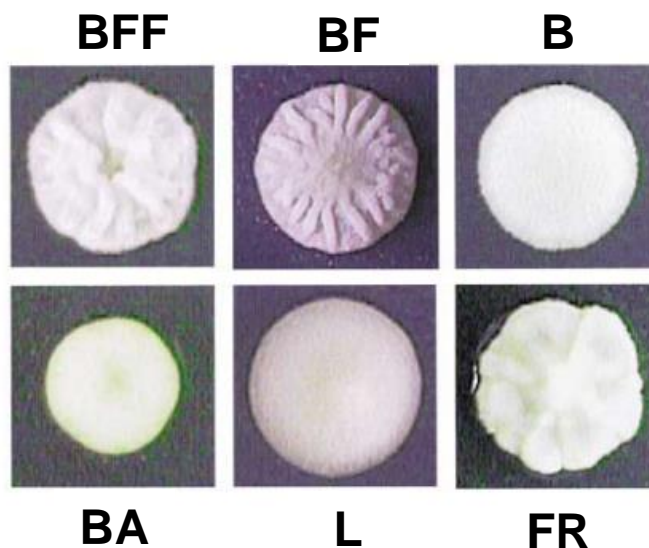
1.6.4 Mudanças fenotípicas

A variação fenotípica tem sido extensivamente avaliada em patógenos microbianos, onde processos como variação de fase e comutação fenotípica podem promover evasão do sistema imune ou tropismos para determinados tecidos. Desta forma, a compreensão destes mecanismos é fundamental para definir como os patógenos microbianos interagem com o hospedeiro (FRAZER, HERNDAY, BENNETT, 2019).

A transição para um estado patogênico por fungos comensais geralmente está relacionada a uma capacidade de sofrer alterações morfológicas e fenotípicas (Figura 5), as quais se refletem em uma mudança rápida e reversível da morfologia

colonial e das características microscópicas, que ocorre em resposta a diferentes estímulos ou estresses ambientais (ICHIKAWA et al., 2004).

Figura 5 – Mudanças na morfologia da colônia de *Trichosporon asahii*



Legenda: Esta espécie foi capaz de apresentar as seguintes características: BFF: branca com fissuras radiais e farinosa, BF: branca, farinosa, B: branca, BA: branco amarelado, L: lisa, FR: fissuras radiais

Fonte: ICHIKAWA et al., 2004.

Karashima et al. (2002) investigaram a passagem *in vivo* de isolados de *T. asahii* ambientais e clínicos. Foram observados o tipo e a forma da colônia após três passagens em camundongos, sendo constatado que os isolados clínicos apresentaram mais mudanças fenotípicas do que os ambientais. Esses resultados sugerem que as mudanças fenotípicas de *T. asahii* ocorreram como resultado das passagens *in vivo*. Este processo pode facilitar que a população fúngica escape do sistema imune do hospedeiro (KARASHIMA et al., 2002).

Em outro estudo com cepas de *T. asahii* também foi observado que os isolados patogênicos apresentam mais mudanças em suas características fenotípicas e morfológicas do que os isolados comensais, o que sugere uma maior virulência, facilitando a invasão e fuga do sistema imunológico do hospedeiro (ICHIKAWA et al., 2004).

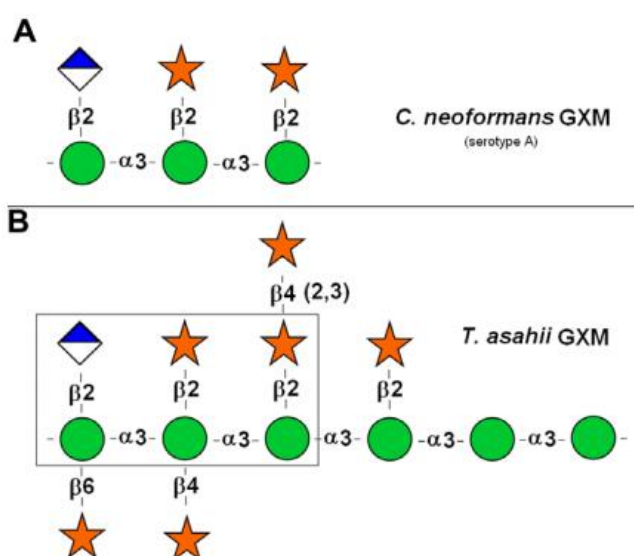
1.6.5 Moléculas associadas à parede celular

1.6.5.1 Glucuronoxilomanana

É sabido que espécies de *Trichosporon* são filogeneticamente próximas a *Cryptococcus* spp. Entre as características em comum, apresentadas por estes dois grupos estão a capacidade de sintetizar GXM. A GXM é um polissacarídeo associado à parede celular de *Trichosporon* spp. e é também secretada para o meio extracelular (FONSECA et al., 2009).

A GXM sintetizada por *Trichosporon* spp. assemelha-se à encontrada na cápsula de *Cryptococcus* spp. sendo formada por xilose, manose e ácido glicurônico, mas diferenciando-se pelo posicionamento da xilose na estrutura do polissacarídeo e pelo número de unidades de manose (Figura 6) (FONSECA et al., 2009).

Figura 6 – Estrutura da glucuronoxilomanana de leveduras dos gêneros *Cryptococcus* e *Trichosporon*



Legenda: Glucuronoxilomanana de *Cryptococcus neoformans* (A) e *Trichosporon asahii* (B). Esferas representam unidades de manose; as estrelas representam unidades de xilose; símbolos em forma de diamante representam unidades de ácido glicurônico. As estruturas da GXM de *Cryptococcus neoformans* e *Trichosporon asahii* diferenciam-se pelo posicionamento da xilose e pelo número de unidades de manose

Fonte: FONSECA et al. 2009.

Enquanto na Família *Trichosporonaceae* esta molécula é pouco estudada, para as espécies de *Cryptococcus* é bem descrita. A GXM criptocócica tem a função

de modular a resposta imune dos pacientes infectados, proteção contra fagocitose e estresse oxidativo, promovendo a sobrevivência deste micro-organismo (FONSECA et al., 2009). Embora os aspectos estruturais da GXM de *Trichosporon* tenham sido descritos, as funções deste polissacarídeo ainda são obscuras (ICHIKAWA et al., 2001; ZIMBRES et al., 2018). É possível que sua função seja a de ajudar a atenuar a ação da fagocitose por células do hospedeiro (MARINÉ et al., 2015b).

Estudos relataram que isolados de *C. neoformans* e de *T. asahii* demonstraram maior resistência à fagocitose quando foram comparadas com espécies de *Candida* (LYMAN; WALSH, 1994). Também foi analisado que *Trichosporon* spp. obtidos de infecções invasivas apresentaram produção de GXM mais significativa (LYMAN et al., 1995). Outro estudo que analisou a síntese de GXM por *T. asahii*, após sucessivas passagens *in vivo*, demonstrou que, após as reinoculações, houve aumento da síntese de GXM (KARASHIMA et al., 2002; ZIMBRES et al., 2018).

Fonseca et al. (2009) observaram que células de *C. neoformans* acapsuladas, quando em contato com o sobrenadante contendo GXM de *T. asahii*, adquiriram uma maior resistência contra a ação de macrófagos do que os isolados sem a presença do polissacarídeo, mostrando desta forma a importância da GXM na virulência do fungo.

1.6.5.2 Melanina

A melanina é um polímero com diversas funções e amplamente distribuído nos diferentes seres vivos. Este tipo de pigmento possui alto peso molecular e é sintetizado através de reações poliméricas oxidativas a partir de compostos fenólicos e normalmente apresenta coloração variando do marrom ao preto (HAMILTON; GOMEZ, 2002).

O alto peso molecular das partículas de melanina as torna muito estáveis e resistentes a vários processos destrutivos, tais como ação de agentes oxidantes, dessecação, temperaturas extremas, luz ultravioleta, metais pesados e diversas drogas (WHEELER; BELL, 1988; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006).

Este polímero desempenha um papel importante para os fungos, atuando como protetor de estresses ambientais. Esta molécula também possui função em fungos patogênicos, sendo considerado um fator de virulência. Este pigmento

protege o fungo dos mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro e de fármacos antifúngicos (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2014).

Este pigmento está presente em várias espécies de fungos patogênicos como, por exemplo: *Fonsecaea pedrosoi* (PINTO et al., 2018), *C. neoformans* (CASADEVALL et al., 2000), *Exophiala dermatidis* (POLAK, 1990), *Lacazia loboi* (TABORDA et al., 1999), *Histoplasma capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2002), *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis* (ALMEIDA-PAES et al., 2016), *Blastomyces dermatidis* (NOSANCHUK et al., 2004), *Aspergillus fumigatus* (YOUNGCHIM et al., 2004) e *Paracoccidioides brasiliensis* (DA SILVA et al., 2006).

Muitos fungos são capazes de sintetizar pigmentos melanina a partir da L-tirosina via dihidroxifenilalanina (DOPA). Esta via metabólica realiza a síntese deste tipo de melanina, chamada de eumelanina. Que exige tirosinases ou lacases hidroxilem a tirosina, via DOPA, para dopaquinona. Então, depois de uma série de reações de ciclização, oxidação, tautomerização e polimerização, a eumelanina é produzida (LANGFELDER et al., 2003).

Constatou-se até o momento que quatro espécies da Família *Trichosporonaceae* são capazes de produzir melanina através desta via metabólica. Em trabalho de Figueiredo-Carvalho e colaboradores (2014) foi constatado que as espécies *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. inkin* e *T. mucoides* produzem melanina utilizando o precursor L-DOPA (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Entre os patógenos oportunistas, as espécies da Família *Trichosporonaceae* são consideradas importantes causadoras de infecções invasivas (BENTUBO; GAMBALE; FISCHMAN, 2013), sendo a segunda mais comum em pacientes com neoplasia hematológicas (COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011). Estudos que avaliem os mecanismos pelo qual o fungo passa do seu estado comensal para patogênico é de suma importância, já que a microbiota caracteriza a fonte de infecção para esses indivíduos imunocomprometidos (DUARTE-OLIEVIRA et al., 2017).

A patogenicidade está intimamente relacionada aos fatores de virulência, uma vez que permitem o estabelecimento e desenvolvimento do fungo no tecido hospedeiro. *Trichosporon asahii*, da Família *Trichosporonaceae* é a principal espécie envolvida em infecções, mas pouco se sabe sobre fatores relacionados à sua virulência (ESPIRITO SANTO et al., 2019). E dentre os principais fatores de virulência dos membros da Família *Trichosporonaceae*, a plasticidade metabólica, mudanças fenotípicas e moléculas associadas à parede são pouco estudados principalmente em espécies menos comuns (DUARTE-OLIEVIRA et al., 2017).

A plasticidade metabólica, ou seja, a capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono é essencial para a virulência de organismos patogênicos, tendo em vista que a fonte nutricional é limitada no parasitismo. Este aspecto é bem caracterizado em *C. albicans*, porém não foi ainda devidamente estudada em *Trichosporon* spp (MIRAMÓN; LORENZ, 2017).

As mudanças fenotípicas são importantes ferramentas em que os micro-organismos conseguem burlar o sistema imunológico do hospedeiro. Este fator de virulência foi descrito apenas em cepas de *Trichosporon asahii* (ICHIKAWA et al., 2004) e não foi apropriadamente estudado em diferentes espécies da Família *Trichosporonaceae*.

A importância da parede celular e de seus componentes na patogênese de diversos fungos tem sido descrita. No caso específico da Família *Trichosporonaceae*, na última década foram descritas a produção de melanina (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2014) e de GXM (ICHIKAWA et al., 2001; KARASHIMA et al., 2002; FONSECA et al., 2009; ZIMBRES et al., 2018), moléculas bem estabelecidas que são características chave na virulência de outros fungos, porém pouco estudadas na Família *Trichosporonaceae*.

Diferentes espécies de uma única família podem apresentar peculiaridades biológicas com respeito aos seus mecanismos de virulência e metabolismo. Desta forma, a avaliação de fatores de virulência pouco explorados em isolados da Família *Trichosporonaceae*, com um tamanho amostral representativo e diferentes gêneros e espécies, é uma oportunidade ímpar de conhecer melhor alguns aspectos de virulência que possam gerar os diferentes quadros clínicos da tricosporonose, ou estarem associados à transição do comensalismo para o parasitismo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os diferentes fenótipos associados à virulência de isolados clínicos da Família *Trichosporonaceae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar molecularmente as espécies da Família *Trichosporonaceae* de isolados clínicos que foram previamente classificados como *Trichosporon sp.* e armazenados em uma coleção de cultura de fungos;
- Avaliar o crescimento de cepas de *Trichosporon spp.* frente às fontes de carbono diferenciadas, como o lactato e N-acetilglicosamina;
- Determinar os tipos e a frequência de variantes fenotípicos de *Trichosporon spp.*;
- Quantificar e analisar a produção de melanina em cepas de *Trichosporon spp.*;
- Verificar a expressão de glucuronoxilomanana em cepas de *Trichosporon spp.*;
- Correlacionar os diferentes fenótipos de virulência estudados e as diferentes espécies.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS CLÍNICOS

As cepas do estudo foram inicialmente isoladas no Instituto Nacional do Câncer (INCA) de pacientes humanos de 1998 a 2010, previamente identificadas fenotipicamente como *Trichosporon* sp. Posteriormente, esses isolados foram depositados no acervo de fungos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz) e preservadas em glicerol a -20 °C.

. Foram incluídas 79 amostras que se apresentaram viáveis após semeadura em Agar Batata dextrose (PDA) (DIFCO™) e incubação por 7 dias a 25 °C. Todos os isolados foram semeados por esgotamento em placas de Petri (90 mm) contendo PDA (DIFCO™) e incubadas a 25 °C por 72 horas, para se obter uma colônia única como forma de confirmar a pureza destes isolados e para o uso das próximas técnicas descritas a seguir. Como o presente estudo não utilizou dados clínicos destes pacientes foi obtido dispensa de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa do INI (Anexo A).

4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada segundo Ferrer e colaboradores (2001) com algumas modificações. Partindo de uma colônia única, foi feito repique em placa de Petri (90 mm) contendo PDA mantido a 25 °C por 48 horas para obtenção de massa celular. Após este processo, toda a massa celular foi transferida para um tubo de microcentrífuga estéril, centrifugada a 18.440 g por um minuto e estocada a -20 °C por cerca de 24 horas. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão de lise (SDS 0,5%; NaCl 1,4%; EDTA 0,73% e Tris-HCl 1M) e 5 µL de β-mercaptoetanol e agitou-se no vortex até que obtivesse uma solução homogênea por cerca de um minuto. A amostra foi incubada a 65 °C por uma hora, sendo agitada a cada meia hora no vortex. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (v: v: v 25:24:1). Agitou-se no vortex até obter uma solução homogênea a qual foi centrifugada a 18.440 g por 15 minutos. Removeu-se o

sobrenadante (cerca de 400 μ L) e o mesmo foi colocado em um novo tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 mL. Foi adicionado um volume igual de isopropanol e homogenizou-se levemente de forma manual. O DNA foi precipitado por 24 horas em freezer a -20 °C. Após este processo, o material foi centrifugado a 4 °C por 18.440 g durante 15 minutos. Foi retirada toda a fase líquida e o precipitado foi lavado com etanol 70% (500 μ L). Novamente, centrifugou-se a 18.440 g por 15 minutos e retirou-se toda a fase líquida. O precipitado obtido foi ressuspenso em 100 μ L de água livre de DNase e armazenado a -20 °C até seu uso.

4.2.2 Avaliação da integridade e quantificação do DNA

Para avaliar a integridade do DNA foi feito um gel de agarose a 1,5% em tampão 1X Tris borato EDTA (90 mM de Tris-Ácido Bórico pH 8,4; 2 mM de EDTA; LGC Biotecnologia) (TBE), adicionado 0,5 μ g/mL de brometo de etídio. A amostra foi inserida no gel, com auxílio de uma pipeta, junto com *loading buffer* (Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol 0,25% e glicerol 30%) na proporção de 2 μ L de tampão para cada 5 μ L do DNA. A eletroforese foi realizada numa tensão de 90 V durante 60 minutos. Em seguida, o gel foi visualizado sob a luz ultravioleta de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20). Após esta etapa, o DNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop™ 2000C (Thermo Fisher Scientific).

4.2.3 Amplificação e sequenciamento da subunidade D1/D2 do 28S rDNA

Foi feita a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar a subunidade D1/D2 da região 28S do rDNA conforme sugerido por Fell e colaboradores (2000). Todos os isolados com volume final de 25 μ L contendo 50 ng do DNA; 1 X tampão da PCR (10 mM de Tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl; Invitrogen™ Brasil); 3 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP; Invitrogen™ Brasil); 2,5 U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Brasil) e 25 μ M cada primer (Invitrogen™ Brasil) NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5' – GGTC CGT GTTCAAGACGG-3') (FELL et al., 2000). Como controle negativo, foram utilizados todos os reagentes, porém sem a adição de DNA.

A PCR foi realizada em um termociclador SimpliAmp Thermal Cycler, com uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95 °C; seguido por 35 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 94 °C; 45 segundos de pareamento a 58 °C e 90 segundos de extensão a 72 °C; terminando com 7 min de uma extensão final a 72 °C.

Ao término da reação foi feito gel de agarose à 1,5% em tampão TBE 1X concentrado adicionado 0,5 µg/mL de brometo de etídio. O produto amplificado teve adição de *loading buffer*, na proporção de 2 µL do tampão para 5 µL do DNA amplificado. A eletroforese foi conduzida numa tensão de 90 V durante 60 minutos. Em seguida, as bandas de DNA foram visualizadas sob a luz ultravioleta de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20).

Após ser observada a amplificação conforme descrito acima, o produto da PCR foi purificado utilizando o kit comercial PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante e enviado à Plataforma de Sequenciamento Genômico PDTIS/ Fiocruz que utiliza o sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems). As sequências geradas foram editadas no programa *Sequencher* versão 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA). As sequências dos isolados foram comparadas com as depositadas nos bancos de dados NCBI/GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CBS (<http://www.westerdijk.institute.nl/Collections/>), sendo alinhadas no programa MEGA versão 6.0. No mesmo programa, árvores filogenéticas foram inferidas pelo método de Neighbor-Joining. A porcentagem de 1000 réplicas pelo método de bootstrap foi anexada em cada ramo. Foram utilizadas 79 sequências oriundas do estudo e 8 sequências de referência na construção da árvore. As sequências de referência foram oriundas do GenBank com os seguintes números de acesso: AF189882, NG055720, KY109943, AF075523, NG056271, KJ094037, AY143554 e NG058996.

4.3 AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE METABÓLICA

Curvas de crescimento dos isolados frente ao lactato e a N-acetilglicosamina foram construídas utilizando metodologia espectrofotométrica, através da semeadura de 100 µL da suspensão de 0,5 McFarland do fungo preparada em solução salina em microplacas de 96 poços com fundo plano contendo 100 µL de meio 2X concentrado base de nitrogênio para leveduras [Yeast Nitrogen Base

(YNB)] (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) acrescido de lactato de sódio (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) e N-acetilglicosamina (Sigma–Aldrich, St Louis, USA). As fontes de carbono foram acrescidas ao meio na concentração final de 0,5%, com posterior incubação a 37 °C e leitura da densidade ótica (530 nm) a cada 24 horas, durante 7 dias. As curvas de crescimento resultantes foram comparadas com o crescimento das cepas em YNB + 0,5% de glicose (Sigma–Aldrich, St Louis, USA). Os isolados foram semeados em triplicata nas placas, e o valor da densidade ótica (DO) foi obtido através da média dos três valores. Este teste foi repetido no mínimo duas vezes por isolado.

A fim de analisar a micromorfologia das diferentes espécies nestas diferentes fontes de carbono, após os 7 dias de incubação a 37 °C, foram pipetados 10 µL do meio com crescimento fúngico em uma lâmina que foi corada com 10 µL de lactofenol azul de algodão (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) e observada em microscópio óptico Zeiss (Axiolab re, São Paulo, Brasil) nos aumentos de 100X e 400X. Um isolado de cada espécie foi utilizado para a análise das suas características microscópicas nas três fontes nutricionais.

4.4 MUDANÇAS FENOTÍPICAS

Em uma placa de petri (90 mm) contendo meio de cultivo de composição Peptona 1% (Difco™), Ágar 2% (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) e D-glucose 4% (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) (Sabouraud Dextrose Agar). Foram semeados em toda superfície da placa 100 µL de uma suspensão contendo 1×10^3 células das cepas de *Trichosporon* com o auxílio de alça de drigalski e incubadas por 72 horas a 37 °C. Foram analisados os diferentes tipos de colônias apresentados e a colônia predominante na placa foi classificada como colônia mãe. Após este período foi realizada a contagem das todas as colônias que foram rapidamente alteradas em comparação à colônia mãe. As colônias com morfologias diferentes da colônia mãe, foram novamente repicadas em placas de Ágar Sabouraud dextrose e incubadas novamente por 72 horas a 37 °C para observar se após o segundo repique conseguiram reverter à colônia mãe, desta forma caracterizando a mudança fenotípica.

4.5 DETECÇÃO DE CARBOIDRATOS SECRETADOS

A detecção de carboidratos secretados pelas cepas de *Trichosporon* spp., dentre os quais destaca-se a GXM, foi realizada através da semeadura do fungo em meio de cultura RPMI 1640 sem bicarbonato e sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) tamponado com 0,165 M de MOPS (3-N-morpholinopropane-sulphonic acid) (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e 1,5% Agar, ajustado o pH 7,0 e posterior incubação a 37 °C por 48 horas. Após este processo, foi coletada uma massa de 300 mg de células, a qual foi suspensa em 1 mL de água destilada estéril, de forma similar àquela descrita por Camargo (1991) e Almeida-Paes (2012) para a obtenção de antígenos secretados por células de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix* spp. respectivamente (CAMARGO et al., 1991; ALMEIDA-PAES et al., 2012). Agitou-se no vortex por um minuto, centrifugou-se a 12.000 g por 4 minutos e foi recolhido o sobrenadante.

A quantificação de carboidratos foi realizada em microplacas de 96 poços e cada amostra analisada em triplicata. Inicialmente 50 µL de amostra foram aplicados, seguidas de 150 µL de ácido sulfúrico e 30 µL de fenol a 5%. A seguir, as microplacas foram incubadas em estufa a 90 °C por 5 minutos, seguido de mais 5 minutos sobre gelo em flocos, conforme descrito por Dubois et al. (1951) e adaptado por Masuko et al. (2004). A leitura foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda de 490 nm. Para o cálculo da concentração de carboidratos, foi construída uma curva padrão com D-glucose (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) (0,03125 - 2 mM ou 1,5625 - 100 nmol) e a concentração inferida através da equação da reta gerada pela regressão linear da curva padrão. Este teste foi realizado no mínimo duas vezes por amostra.

Para avaliar se há relação entre a dosagem de carboidratos total e a presença de GXM nas amostras, realizou-se o teste de aglutinação em látex com esferas sensibilizadas com anticorpo que reconhece GXM. Foi utilizado o kit comercial CALAS® - Sistema de Aglutinação de Látex Antígeno Criptocócico (Meridian Bioscience), sendo o teste executado segundo as instruções do fabricante. Em resumo, as amostras foram diluídas em PBS, em diferentes concentrações, variando de 1:1 – 1:524.288. Em cartões de reação foram aplicados 25 µL dos controles positivo e negativo fornecido pelo kit, e em seguida uma gota do reagente de detecção de látex (partícula de látex revestida por globulina de coelho anti-GXM). As

amostras diluídas em PBS foram aplicadas nas mesmas condições. Os cartões foram submetidos a agitação de 125 RPM por 5 minutos em agitador orbital (Fanem modelo 255). A reação foi realizada em diferentes diluições dos isolados, e a titulação de GXM foi considerada pela menor concentração da amostra na qual ocorreu aglutinação. Foram comparados os valores de densidade óptica da quantificação e a titulação da aglutinação. Cepas de *Cryptococcus neoformans* (H99/ WM846/ ATCC 208821) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente, para ambos os testes.

4.6 ANÁLISE DA MELANINA

4.6.1 Quantificação

Células fúngicas de *Trichosporon* sp. foram semeadas em tubos de ensaio (20x200 mm) contendo meio PDA e mantidas a 25 °C por 48 horas. Em seguida, uma suspensão de células fúngicas foi preparada em 3 mL de solução salina estéril e a densidade óptica ajustada com o auxílio de um densitômetro (DensiCHEK plus, Biomérieux) para o padrão nº 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^5 - 10^6 células por mL. A seguir, 100 µL desta suspensão foram transferidos para microplacas de 96 poços de fundo plano contendo, em cada poço, 100 µL de meio mínimo [29,4 mM de KH_2PO_4 ; 10 mM de MgSO_4 ; 13 mM de glicina; 15 mM de D-glucose; 3µM de Tiamina-HCl (pH5,5)] 2X concentrado. Essas placas serviram como controle de crescimento fúngico. A produção da melanina foi avaliada em microplacas contendo o mesmo meio mínimo, porém suplementado com L-DOPA (3,4 Dihidroxi-L-fenilalanina). Todas as microplacas foram incubadas a 37 °C por 4 semanas em ausência de luz, para prevenir a fotopolimerização da L-DOPA. Todos os poços das extremidades da placa foram preenchidos com 200 µL de água destilada estéril para que não ocorresse ressecamento do meio de cultura. A leitura dos resultados foi realizada através de um espectrofotômetro (Epoch, Biotek) em comprimento de onda de 340 nm, sendo a DO da placa teste (com L-DOPA) subtraída da DO da placa controle (sem L-DOPA). Cada isolado foi colocado em duplicata nas placas e os valores da DO em cada condição experimental foram obtidos através da média da DO nos dois poços onde os isolados foram inoculados.

4.6.2 Extração de partículas de melanina

Nove isolados de *T. não-asahii* e um de *T. asahii* foram selecionados para que pudéssemos realizar estudos sobre as características das melaninas. Os isolados foram cultivados em garrafas de erlenmeyer contendo meio mínimo [29,4 mM de KH₂PO₄; 10 mM de MgSO₄; 13 mM de glicina; 15 mM de D-glucose; 3µM de Tiamina-HCl (pH5,5)] e L-DOPA. Foram mantidos sob agitação a 35 °C por 14 dias em ausência de luz, para prevenir a fotopolimerização da L-DOPA. Após isso, foi centrifugado a 10.842 g por 13 min, a fim de remover e descartar o sobrenadante.

As células fúngicas foram lavadas, após serem cultivadas nas condições descritas acima, em uma solução contendo 1 mol/L sorbitol, pH 5,5. Em seguida foram gerados protoplastos através da incubação das células durante uma hora (sendo agitado com 30 minutos) a 30 °C com enzimas líticas derivadas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). A ação enzimática foi interrompida com três lavagens das células com PBS. Em seguida, as células foram tratadas com solução 4,0 mol/L de tiocianato de guanidina (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) durante uma hora a temperatura ambiente com agitação constante realizada com auxílio de um vortex. O material resultante foi mais uma vez lavado em PBS, colhido através de centrifugação e aquecido a 100 °C em solução 6,0 mol/L de ácido clorídrico (Dinâmica, Rio de Janeiro, Brasil) para hidrolisar contaminantes celulares associados à melanina. Os detritos resultantes foram recolhidos por centrifugação 10.842 g e lavados exaustivamente com PBS. As partículas resultantes foram examinadas com um microscópio óptico Zeiss (Axiolab re, São Paulo, Brasil) em aumentos de 400 e 1000X.

4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As partículas de melanina geradas através de tratamento com desnaturantes e ácido quente, foram lavadas em solução salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7.2 ± 0.2 para remover detritos ou materiais estranhos à amostra. Em seguida, foram aderidas em lamínulas recobertas com poli-L-lisina 0,01% (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) por 60 minutos e secas em atmosfera rica em nitrogênio gasoso. Por fim, foram montadas em bases metálicas (*stubs*), revestida por *sputtering* de ouro de 10 -

15 nm (Balzers Union FL-9496, Balzers), e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta FEG 450), operando a uma tensão de 10kV.

4.6.4 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de raios X por dispersão em energia (SEM-EDS)

A composição fundamental dos elementos constituintes da melanina das amostras foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura com EDS (do inglês *scanning electron microscopy energy-dispersive x-ray spectroscopy*). A análise de EDS geralmente envolve a geração de um espectro de raios X a partir de toda a área do campo de microscopia eletrônica de varredura. Esta consiste na identificação das linhas no espectro de raios X usando tabelas de energias ou comprimentos de onda e a análise quantitativa EDS (determinação das concentrações dos elementos presentes) medindo a linha intensidades para cada elemento da amostra e para os mesmos elementos nos padrões de calibração de composição conhecida. A microscopia foi realizada no microscópio de varredura FEI Quanta FEG 450 with Apollo X - EDAX.

4.6.5 Potencial zeta e condutância

O potencial zeta (ζ), a mobilidade das partículas, e frequência de desvio das amostras de melanina foram calculados em um analisador de potencial zeta (NanoBrook Omni particle, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY). O ζ é uma medida de carga (em milivolts) definido como o gradiente de potencial que se desenvolve em toda a interface de um líquido e a fronteira em contato com um sólido. O potencial zeta é derivado da equação $\zeta = (4 \pi \eta m)/D$, onde D é a constante dielétrica do meio, η é a viscosidade, e m é a mobilidade eletroforética das partículas. No mínimo dez leituras diferentes foram realizadas para cada uma das amostras.

Além dos valores do potencial zeta o NanoBrook avaliou a condutância, ou seja, a aplicação da força elétrica, que está diretamente proporcional ao número de íons apresentados por estas amostras.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados dos experimentos foram inseridos em bancos de dados próprios para análise posterior. Testes paramétricos e não paramétricos (por ex., teste de Fisher, T de student e Coeficiente de Correlação de Spearman) foram realizados no software Graph Pad Prism 5, com p -valor menor que 0,05 para apuração da significância. Estes testes foram utilizados conforme a adequação e necessidade nas diferentes análises e comparações. Foram utilizadas comparações entre todas as espécies e também espécies *T. asahii* e *T. não asahii*.

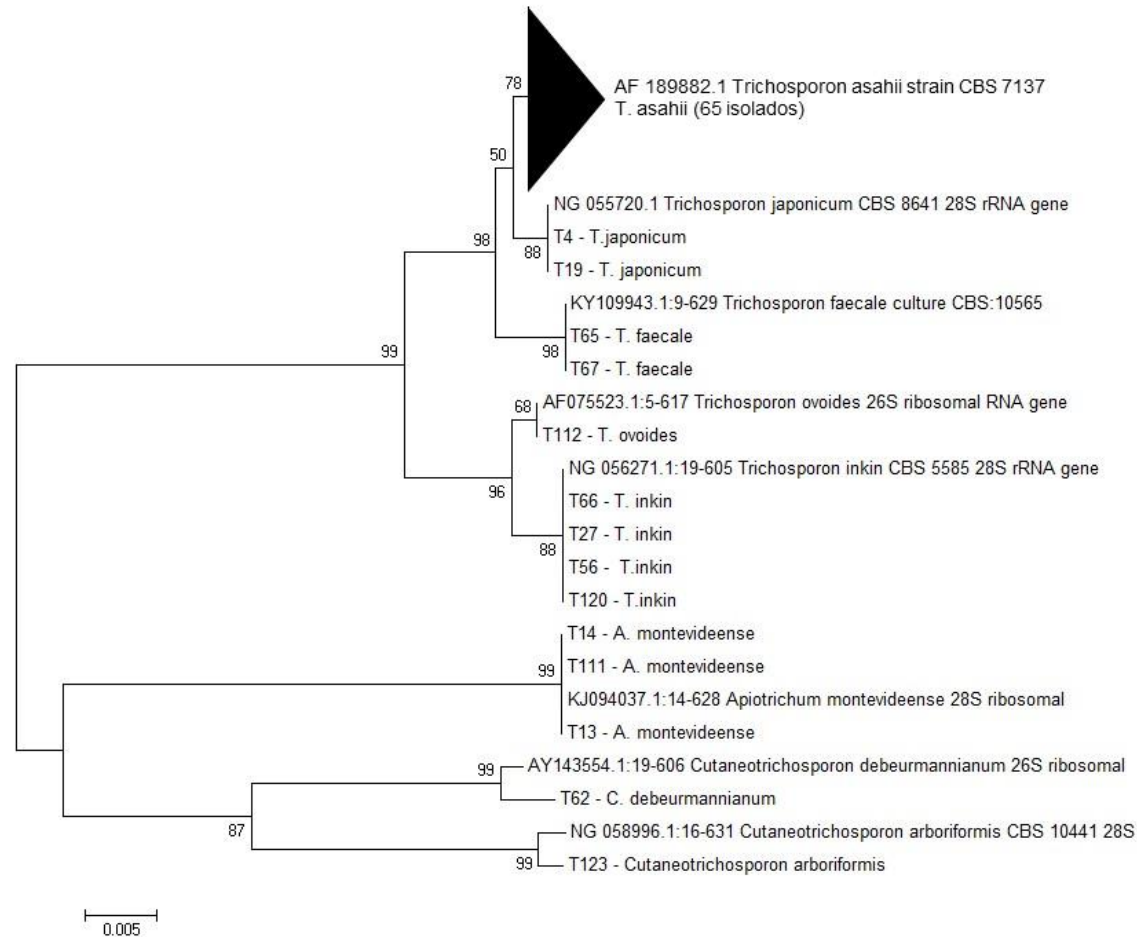
5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação molecular dos isolados foi realizada através do sequenciamento da subunidade D1/D2 da região 28S do rDNA. Todos os isolados do estudo (n=79) foram caracterizados, sendo eles identificados como *Trichosporon asahii* (n=65, 82,27%); *Trichosporon inkin* (n=4, 5,05%); *Apiotrichum montevidense* (n=3, 3,79%); *Trichosporon japonicum* (n=2, 2,53%); *Trichosporon faecale* (n=2, 2,53%); *Trichosporon ovoides* (n=1, 1,27%); *Cutaneotrichosporon debeurmannianum* (n=1, 1,27%) e *Cutaneotrichosporon arboriformis* (n=1, 1,27%).

A Figura 7 apresenta a árvore filogenética gerada pelo método Neighbor-Joining contendo todas as sequências geradas neste estudo e sequências de referência da Família *Trichosporonaceae* presentes em bancos de dados genômicos. Todos os isolados apresentaram 99-100% de similaridade quando comparados com as sequências das espécies identificadas e depositadas nos bancos de dados CBS e NCBI/GenBank (Apêndice A).

Figura 7 – Análise filogenética molecular pelo método de Neighbor-Joining

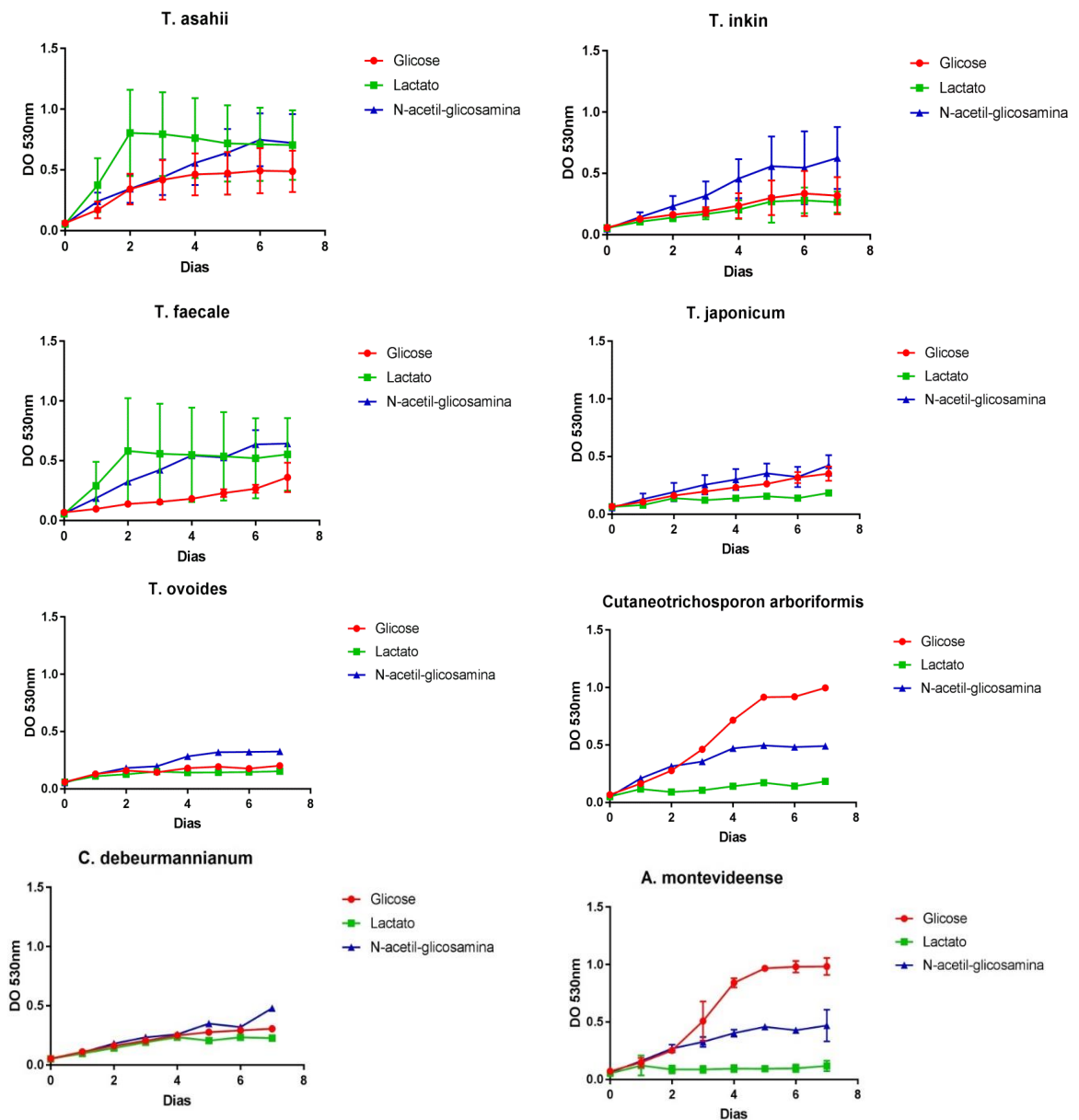


Legenda: A história evolutiva das espécies da Família *Trichosporonaceae* foi inferida usando o método Neighbor-Joining pelo software MEGA 6. A porcentagem das 1000 réplicas pelo método de bootstrap foi anexada em cada ramo. Para inferência da árvore foi utilizadas um total de 572 posições nucleotídicas da subunidade D1/D2 da região 28S do rDNA. Foram utilizadas 79 sequências oriundas do estudo e 8 sequências de referência, extraídas do GenBank. (FELSENSTEIN, 1985, TAMURA; NEI; KUMAR, 2004).

5.2 PLASTICIDADE METABÓLICA

As curvas de crescimento das 8 espécies identificadas no presente estudo foram avaliadas em três diferentes fontes de carbono. Os valores de DO comparam o crescimento de todos os isolados frente à glicose, lactato e N-acetilglicosamina durante os sete dias e estão representados na figura 8.

Figura 8 – Crescimento das espécies da Família *Trichosporonaceae* frente à glicose, lactato e N-acetilglicosamina



Legenda: Análise das curvas de crescimento de todas as espécies da Família *Trichosporonaceae*. Média e desvio padrão para cada espécie e açúcar nos sete dias analisados estão representados.

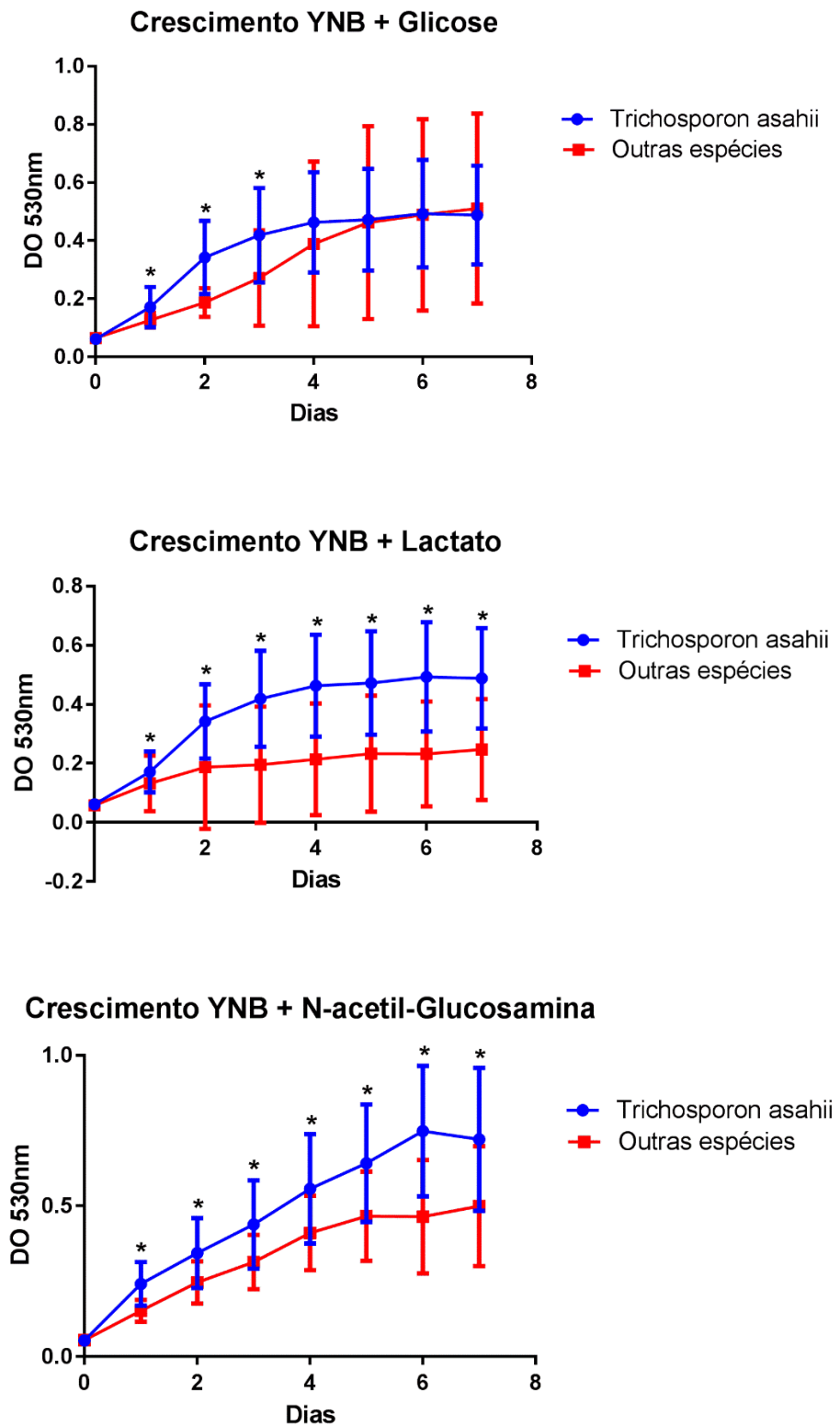
De um modo geral, percebeu-se que *T. asahii* e *T. faecale* crescem melhor na presença de lactato e N-acetilglicosamina, *T. inkin* na fonte de N-acetilglicosamina e *A. montevideense* e *C. arboriformis* na fonte de glicose. Por outro lado, *T. ovoides*, *T. japonicum* e *C. debeurmannianum* crescem muito menos que as demais espécies estudadas nas fontes de carbono avaliadas.

A fim de comparar o crescimento das espécies *T. asahii* e não-*asahii* foram construídas três curvas de crescimento, uma para cada tipo de açúcar. O crescimento de *T. asahii* foi melhor nas três fontes nas primeiras 72 horas de leitura comparada às outras espécies deste estudo.

Na curva de crescimento das espécies *asahii* e não-*asahii* frente à glicose, após 72 horas, a curva de crescimento das espécies não-*asahii* apresentaram melhor crescimento, devido ao bom crescimento das espécies *C. arboriformis* e *A. montevideense* nesta fonte.

E na presença das fontes alternativas de carbono, como o caso do lactato e N-acetilglicosamina, *T. asahii* apresentou um melhor crescimento durante os 7 dias (Figura 9).

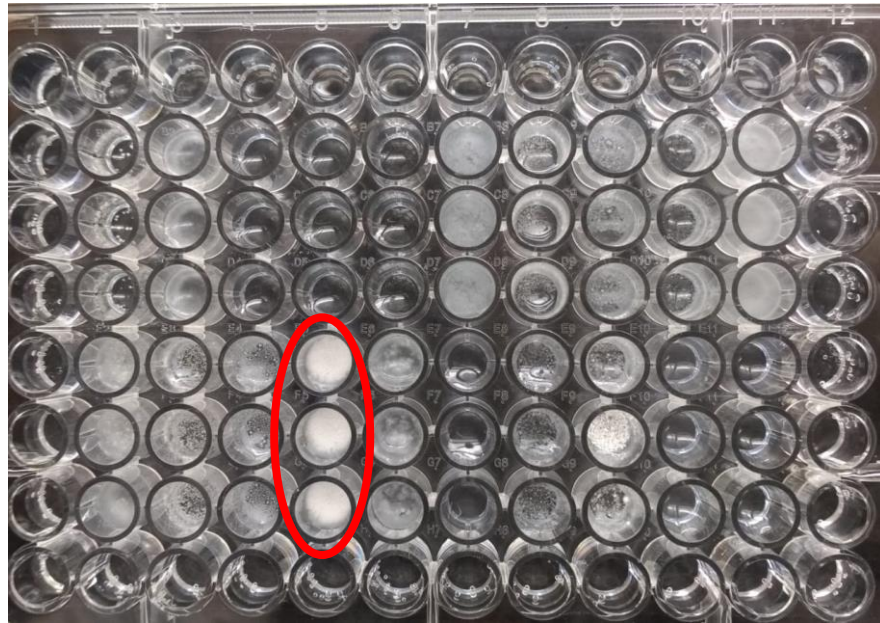
Figura 9 - Crescimento das espécies de *Trichosporon asahii* e não-*asahii* frente à glicose, lactato e N-acetilglicosamina



Legenda: Análise das curvas de crescimento dos isolados de *T. asahii* e não-*asahii*. Média e desvio padrão para cada espécie e açúcar nos sete dias analisados estão representados. O teste realizado para esta análise foi o Mann Whitney, os asteriscos indicam que o p -valor foi significativo, ou seja, menor que 0,05.

Alguns isolados quando cultivados em lactato e N-acetilglicosamina apresentaram filimentação possível de ser detectada macroscopicamente (Figura 10). Todos os isolados que apresentaram a característica de elevada filimentação pertencem à espécie de *T. asahii* e, dentre estes, 13,9% demonstraram esta capacidade nas duas fontes de carbono citadas anteriormente.

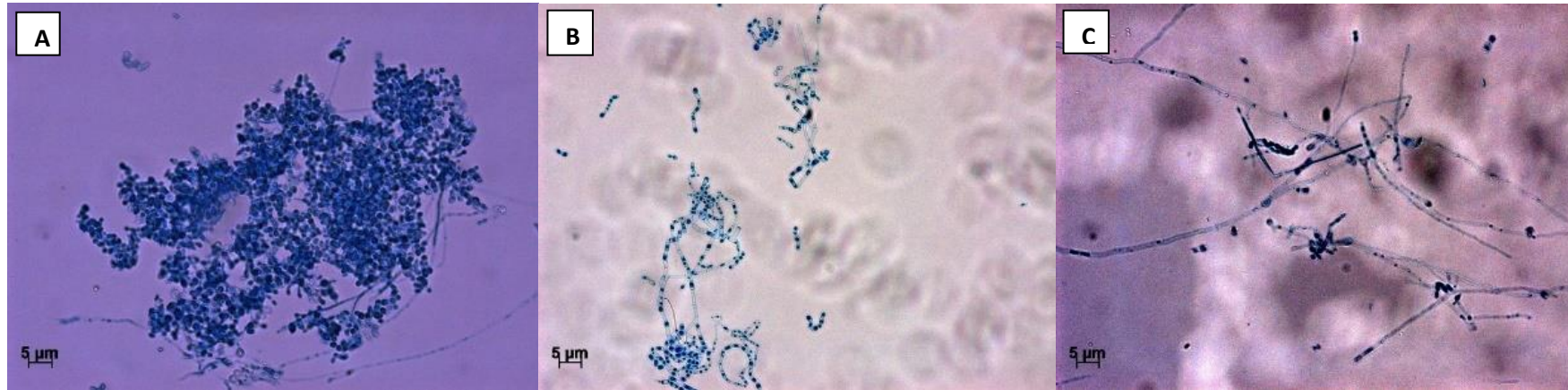
Figura 10 – Cultura celular apresentando filimentação de *Trichosporon asahii* em microplaca de 96 poços



Legenda: Macroscopia do crescimento de *T. asahii* em microplaca de 96 poços cultivado por 7 dias a 37 °C em YNB + lactato.

A microscopia óptica de um isolado de *T. asahii* evidenciou que na presença dos meios YNB + glicose houve a predominância de blastoconídios, no YNB + lactato observou-se hifas se desarticulando em artroconídios e YNB + N-acetilglicosamina a formação de hifas verdadeiras (Figura 11). Na presença de glicose este isolado apresentou agregação celular de blastoconídios, esses grumos podem sugerir o início de uma formação de biofilme.

Figura 11 – Morfogênese de isolado de *Trichosporon asahii* em diferentes fontes de carbono



Legenda: Comparação do crescimento do isolado *Trichosporon asahii* (T86) em meio YNB acrescido de diferentes fontes de carbono. O isolado foi incubado a 37 °C por 7 dias. A) Meio YNB + 0,5% de glicose com predomínio de blastoconídios. B) Meio YNB + 0,5% de lactato com hifas se desarticulando em arthroconídios. C) Meio YNB + 0,5% de N-acetilglicosamina com hifas verdadeiras.

Resultados da microscopia óptica mostraram que o isolado de *T. asahii* produziram hifas nas três fontes de carbono, sendo elas, glicose, lactato e N-acetilglicosamina. Quanto às espécies não *asahii* somente a espécie *T. japonicum* produziu hifas na presença de lactato e N-acetilglicosamina. As duas espécies do gênero *Cutaneotrichosporon* (*C. debeurmannianum* e *C. arboriformis*) apresentaram hifas somente quando cultivadas na presença de N-acetilglicosamina. As espécies *A. montevideense*, *T. faecale*, *T. inkin* e *T. ovoides* não produziram hifas em nenhuma das fontes de carbono avaliadas (Apêndice B).

5.3 MUDANÇAS FENOTÍPICAS

A quadro 1 apresenta um resumo dos resultados de mudanças fenotípicas nas colônias dos isolados estudados. Dentre todos os isolados, em 49 (62,02%) deles não foi observada a capacidade de mudanças macroscópicas nas colônias após um período de 72 horas de incubação a 37° C. Embora a porcentagem dos isolados de *T. asahii* capazes de realizar mudanças fenotípicas seja maior, o teste de Fisher não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre *T. asahii* e as espécies não *asahii* ($p= 0,0671$).

Quadro 1 – Resultado do teste de mudanças fenotípicas para isolados da Família *Trichosporonaceae*

Espécie	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total
<i>T. asahii</i>	28 (43,07%)	37 (56,92%)	65
<i>T. japonicum</i>	1 (50%)	1 (50%)	2
<i>A. montevideense</i>	0	3 (100%)	3
<i>T. inkin</i>	1 (25%)	3 (75%)	4
<i>C. debeurmannianum</i>	0	1 (100%)	1
<i>T. faecale</i>	0	2 (100%)	2
<i>T. ovoides</i>	0	1 (100%)	1
<i>C. aboriformis</i>	0	1 (100%)	1
Total	30 (37,97%)	49 (62,02%)	79

Legenda: Número e porcentagem de amostras que foram positivas e negativas para o teste de mudanças fenotípicas.

Os 30 isolados (37,97%) que apresentaram mudanças fenotípicas nas colônias variaram de 2 a 4 tipos de colônias diferentes (quadro 2). A figura 12

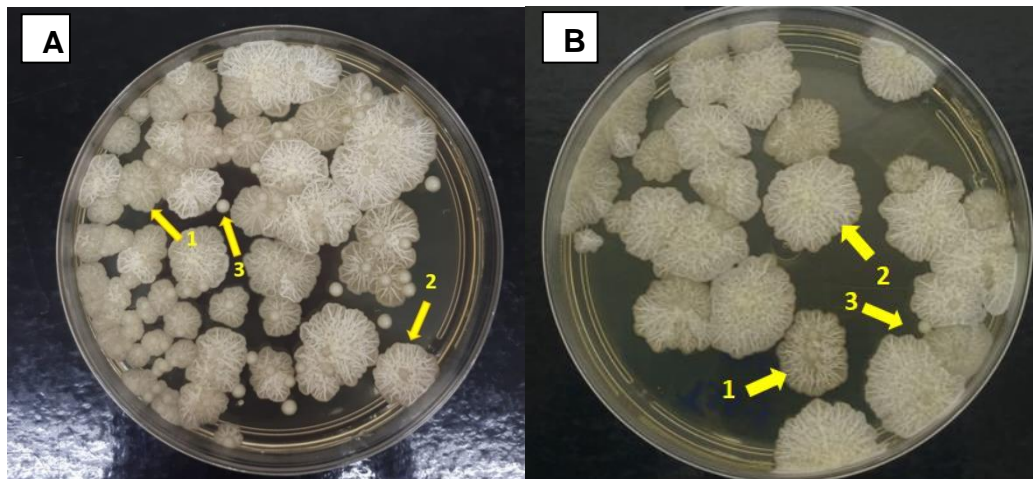
exemplifica um isolado de *T. asahii* que foi positivo para o teste de mudanças fenotípicas.

Quadro 2 – Quantidades de colônias apresentados por isolados com mudança fenotípica positiva

Espécies	Quantidades de colônias diferentes		
	N°=2	N°=3	N°=4
<i>T. asahii</i> (n=28)	17 (60,71%)	10 (35,71%)	1 (3,57%)
<i>T. japonicum</i> (n=1)	1 (100%)	-	-
<i>T. inkin</i> (n=1)	1 (100%)	-	-

Legenda: Quantidade e porcentagem de diferentes colônias que isolados de *T. asahii*, *T. japonicum* e *T. inkin* apresentaram quando incubados a 37 °C por 72 horas. N° = número de colônias diferentes apresentadas.

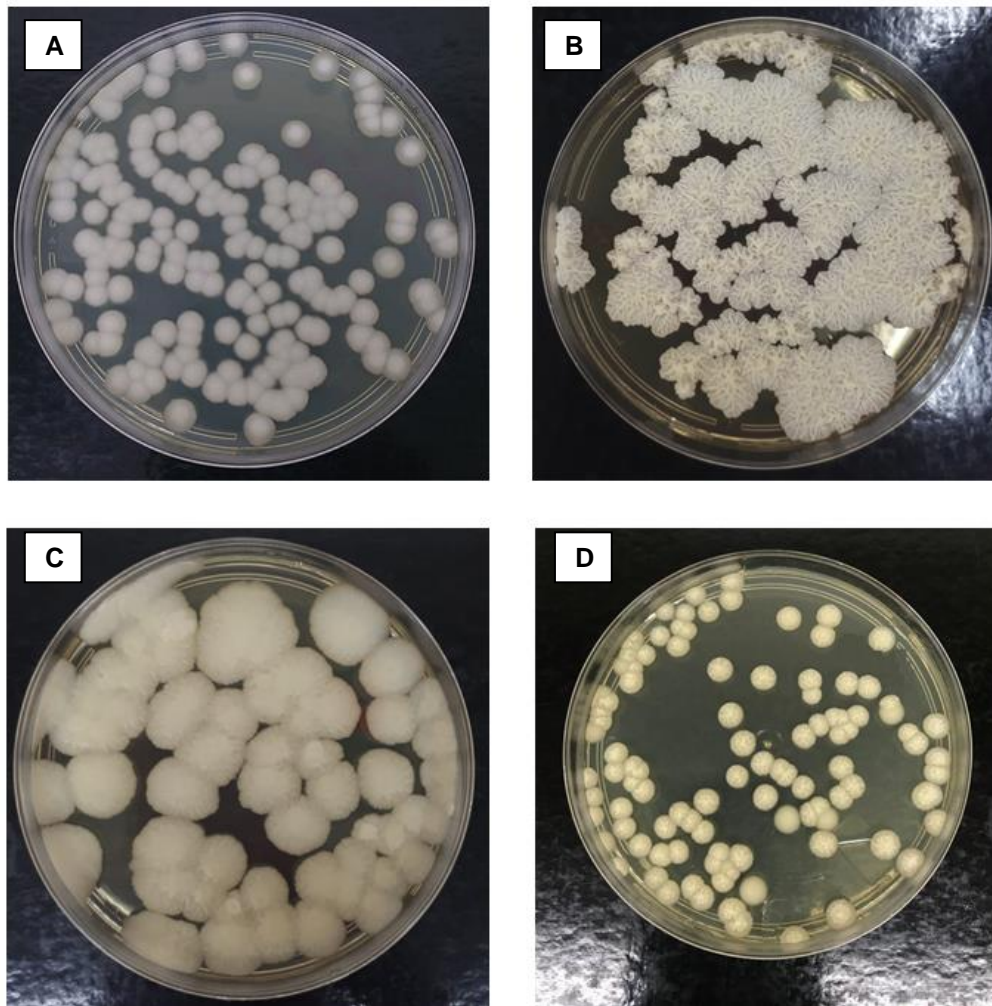
Figura 12 – Isolado com mudança fenotípica positiva



Legenda: A) Ilustração isolado de *T. asahii* do estudo incubado pela primeira vez a 37 °C por 72 horas apresentando três tipos de colônias diferentes, representadas pelas setas 1,2 e 3; B) Segundo repique feito com a colônia 3 do isolado de *T. asahii* da placa A e incubado a 37 °C, apresentando os mesmos três tipos de colônias. As colônias mantiveram o mesmo comportamento após o segundo repique, apresentando as mesmas mudanças de fenótipo.

As morfologias das colônias apresentaram diferentes cores e texturas. Que foram classificadas como: branca e lisa, branca e rugosa, creme e lisa e creme e rugosa (Figura 13).

Figura 13 – Características morfológicas das colônias de *Trichosporon* spp.



Legenda: A: branca e lisa; B: branca e rugosa; C: creme e lisa e D: creme e rugosa

De um modo geral, 44 (55,69%) isolados tiveram textura lisa; 10 (12,65%) com textura rugosa e 25 (31,64%) isolados apresentaram textura mista, com algumas colônias lisas e outras rugosas. Quanto à coloração, as colônias variaram de branca a creme. Foram observadas 66 (83,54%) isolados com colônias brancas; 10 (12,65%) com colônias de coloração creme e brancas e 3 (3,79%) com coloração predominantemente creme.

As colônias de *T. japonicum* se mostraram com aspecto bem particular, bastante rugoso e seco quando incubados em tubos contendo PDA a 25 °C. Mas quando incubados a 37 °C, em placas de petri (90 mm) contendo Ágar Sabouraud dextrose, apresentaram colônias lisas e brilhosas. Um isolado foi positivo para o teste de mudanças fenotípicas e o outro negativo.

Os isolados de *A. montevideense* se apresentaram com texturas lisas e cremosas, semelhante às colônias de *Candida* spp. Todos os isolados desta espécie não tiveram mudanças em seu fenótipo após a incubação a 37 °C por 72 horas.

As espécies de *C. debeurmannianum* e *T. faecale* expressaram textura lisa, aspecto úmido e brilhante, coloração branca e colônias pequenas. Todas as cepas destas espécies não foram capazes de realizar mudanças fenotípicas.

Os isolados de *T. inkin* apresentaram colônias mistas e algodonosas, diferenciando-se da maioria dos outros isolados. Nesta espécie, um isolado apresentou mudança fenotípica com predominância de colônias algodonosas e algumas lisas.

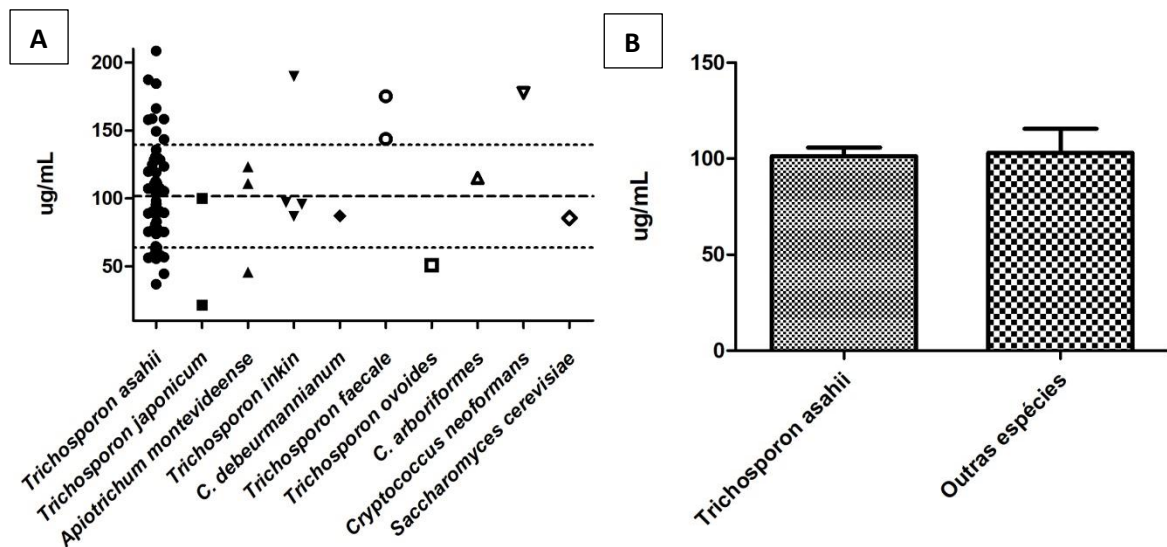
Os isolados de *T. asahii*, na maioria dos casos, apresentaram colônias lisas (55,38%); alguns produziram colônia lisa e rugosa (35,38%) e 9,23% deles apresentaram colônia apenas rugosa. Quanto à coloração, 52 (80%) apresentaram colônias brancas, 3 (4,61%) brancas e cremes e 10 (15,38%) cremes.

Foi observado que, em isolados capazes de realizar mudança fenotípica, houve predomínio de colônias lisas e rugosas, ou seja, a característica que mais sofreu alteração foi a textura da colônia. E nos isolados que não apresentaram para mudança fenotípica, houve predomínio de colônias lisas (Apêndice B).

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS SECRETADOS

Todos os isolados foram capazes de secretar carboidratos com valores de 101,6 ug/mL em média. Chamam a atenção os isolados de *T. asahii*, que apresentaram variação na concentração de carboidratos de 36,8 a 208,5 ug/mL. Somente o controle positivo e alguns isolados das espécies *T. asahii*, *T. inkin* e *T. faecale* tiveram valores de secreção de carboidratos acima do desvio padrão da média (Figura 14 A). Todavia, quando comparados espécies de *T. asahii* com as outras espécies não houve diferença estatisticamente significativa, com p -valor = 0,8754 (Figura 14 B).

Figura 14 – Quantificação de carboidratos secretados por isolados da Família *Trichosporonaceae*



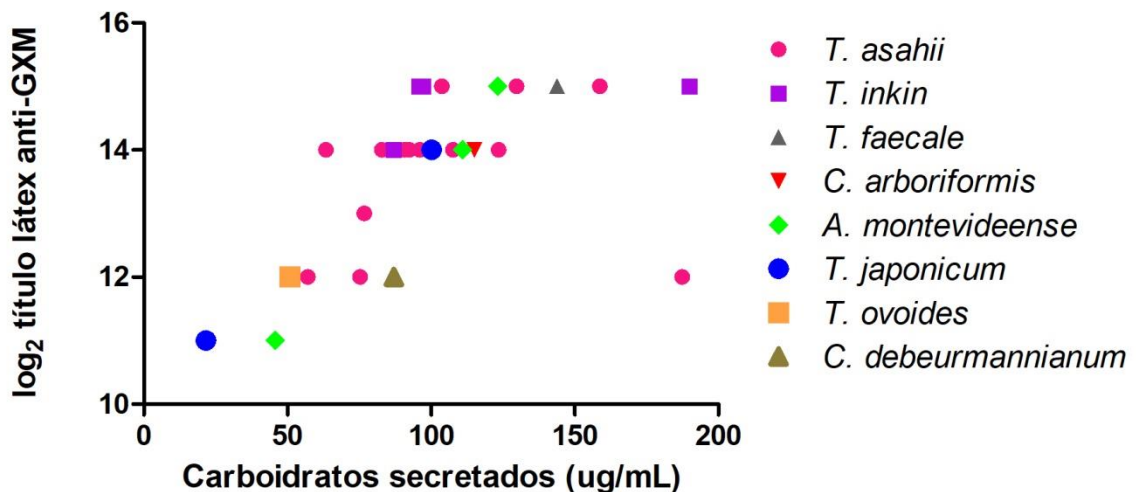
Legenda: A) Valores de quantificação de carboidratos secretados por cada isolado das oito diferentes espécies do estudo. A linha tracejada expressa a média, enquanto linhas pontilhadas os desvios padrão superior e inferior da média. B) Análise comparativa da quantificação de carboidratos para isolados de *T. asahii* e não *asahii*, onde são apresentados a média e o desvio padrão dos dois grupos dos isolados: p -valor = 0,8754.

Destes isolados, 30 deles (37,97%) foram selecionados para o teste semiquantitativo de aglutinação em látex, a fim de avaliar se a concentração de GXM nos extratos está correlacionada com a dosagem de carboidratos total. O teste de aglutinação em látex foi realizado em todas as espécies não-*asahii* (13 isolados do estudo e os 2 controles) e 15 *T. asahii* escolhidos de acordo com a dosagem de carboidratos de forma a abranger isolados com alta, média e baixa produção de

carboidratos secretados, bem como nos controles *C. neoformans* (H99/ WM846/ ATCC 208821) e *S. cerevisiae* (ATCC 2601).

A figura 15 apresenta a correlação entre os títulos de GXM obtidos através da aglutinação em látex e a dosagem total de carboidratos secretados. Verificou-se uma correlação positiva entre ambas as variáveis (coeficiente de correlação de Spearman $r = 0,7183$) e $p < 0,0001$, indicando significância estatística entre as duas dosagens.

Figura 15 – Correlação do valor da quantificação de carboidratos com titulação do látex em isolados da Família *Trichosporonaceae*



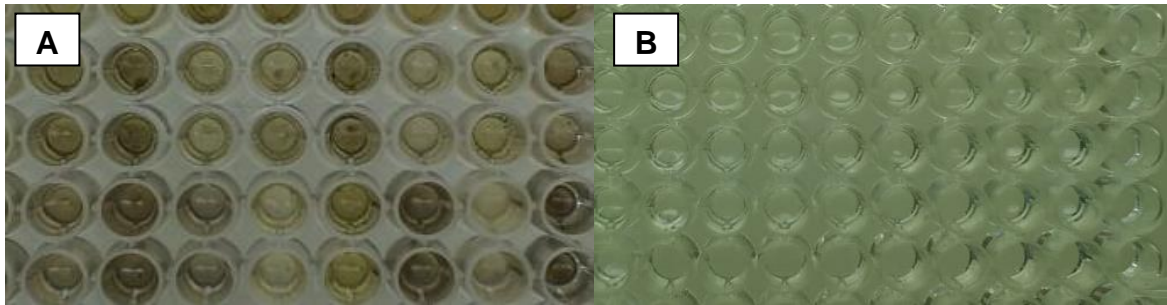
Legenda: Valores da quantificação de carboidratos realizada através do método colorimétrico em microplaca de 96 poços utilizando ácido sulfúrico e fenol. Comparadas à titulação realizada através do método de aglutinação de Látex Antígeno Criptocócico (Meridian Bioscience).

5.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE MELANINA

5.5.1 Quantificação de melanina por cepas da Família *Trichosporonaceae*

Todos os 79 isolados foram capazes de produzir pigmento compatível com melanina, somente na presença de L-DOPA (Figura 16). As placas de meio mínimo com e sem L-DOPA foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. Para a análise semiquantitativa da produção da melanina, foi subtraído do valor de DO da produção com L-DOPA a DO do fungo crescido na ausência de L-DOPA.

Figura 16 – Produção de melanina por isolados da Família *Trichosporonaceae*

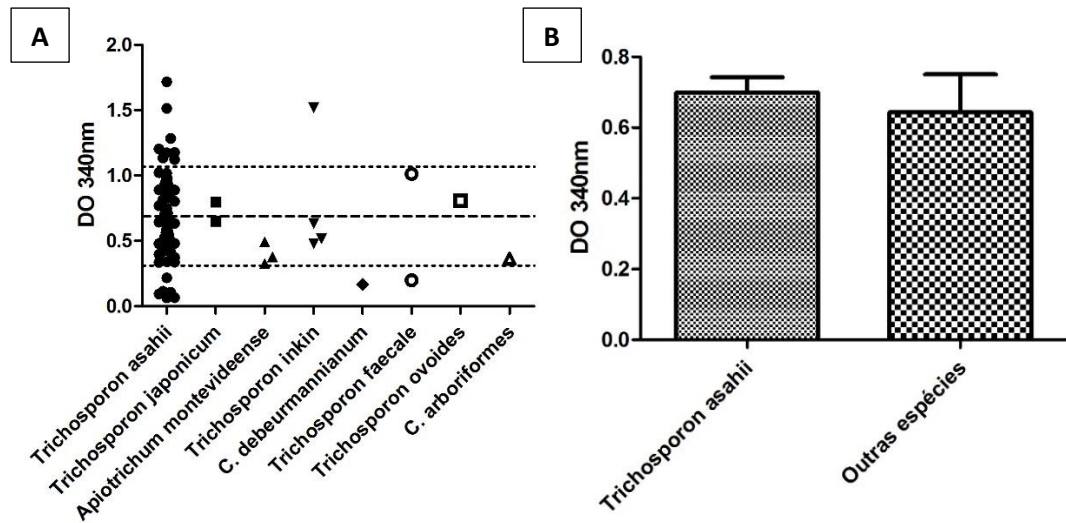


Legenda: A) Crescimento fúngico com coloração escura evidenciando a produção de melanina pelo fungo na presença de L-DOPA. B) Controle do crescimento fúngico, utilizado como branco, em meio mínimo sem L-DOPA.

Os valores de DOs correspondentes à produção de melanina pelos diferentes isolados variaram de 0,06 – 1,87 com uma média de 0,68 e desvio padrão de 0,37. Todos os isolados de *A. montevidense*, *T. faecale* e *C. arboriformis* apresentaram valores menores que a média. Todas as cepas de *T. inkin* apresentaram DOs próximas da média, com exceção de um isolado, que se mostrou o maior produtor de melanina. As cepas das espécies *T. japonicum* e *T. ovoides* apresentaram resultados bem semelhantes, variando de 0,65 a 0,80 (Figura 17 A).

Em relação à espécie *T. asahii*, observou-se uma média de 0,69 e desvio padrão de 0,35 com valores heterogêneos entre os isolados. Dentro deste grupo, alguns isolados mostraram-se bons produtores de melanina com valores de DO de 1,87 e 1,51 respectivamente. Os isolados que menos produziram melanina neste grupo tiveram valores de DO de 0,06. Não foi verificada diferença significativa (p -valor = 0,59) entre a produção de melanina de *T. asahii* e as demais espécies estudadas (Figura 17 B).

Figura 17 – Quantificação da produção de melanina em isolados da Família *Trichosporonaceae*

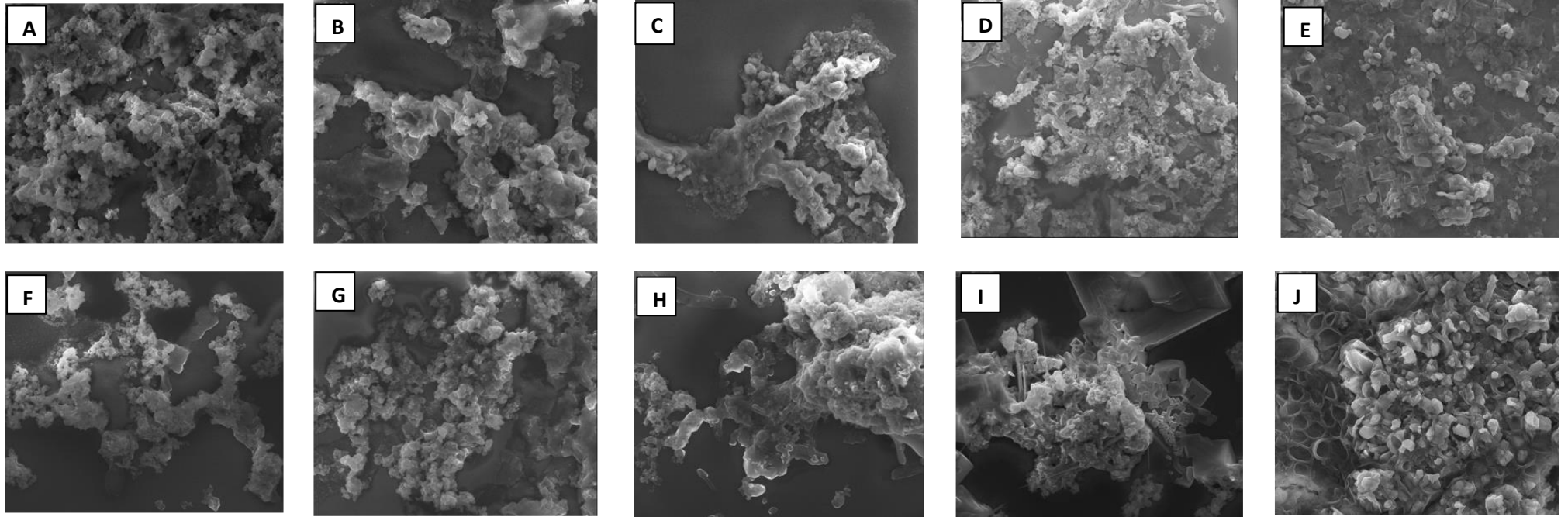


Legenda – Quantificação de melanina avaliada através de valores de densidade ótica em comprimento de onda de 340 nm, após incubação de 37 °C por 28 dias. A) Análise da quantificação da melanina da Família *Trichosporonaceae* incluída no estudo. A linha tracejada expressa a média, enquanto a linha pontilhada expressa os desvios padrão superior e inferior da média. B) Análise comparativa da quantificação de melanina para isolados *T. asahii* e não-*asahii* (p -valor = 0,59).

5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (HRSEM)

A microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (HRSEM) dos pigmentos de melanina das espécies não-*asahii* do estudo permitiu evidenciar aglomerados coesos, mesmo após sonicação dos polímeros, com distintos formatos e dimensões, tal como pode-se evidenciar na figura 18.

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *T. não asahii* comparadas à cepa de referência *Cryptococcus neoformans* (H99)



Legenda – A) *T. japonicum*; B) *A. montevidense*; C) *T. inkin*; D) *T. inkin*; E) *C. debeurmannianum*; F) *T. faecale*; G) *A. montevidense*; H) *T. ovoides*; I) *C. arboriformis*; J) *Cryptococcus neoformans* (H99). Aumento de 30 μm .

5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de raios X por dispersão em energia (SEM-EDX)

Os resultados da análise pela técnica SEM-EDX evidenciaram diferenças na composição química da melanina, dependendo da espécie estudada. Esta análise foi realizada nas espécies não-*asahii* do estudo, em um isolado de *T. asahii* e *C. neoformans* (H99). Foram encontrados 17 diferentes elementos químicos nas amostras de melanina das diferentes espécies. De forma geral, todas as amostras apresentaram maiores concentrações de carbono, oxigênio e sódio.

Curiosamente, somente a espécie *C. arboriformis* apresentou bário (Ba) e o isolado *T. japonicum* vanádio (V). Alguns isolados apresentaram menos elementos químicos na composição, como por exemplo, *C. debeurmannianum*, *T. faecale* e *A. montevidense* com apenas 7 elementos químicos. Já *T. asahii* e uma amostra de *T. inkin* apresentaram 14 dos elementos encontrados. O quadro 3 expressa de forma detalhada os resultados da avaliação da composição química das partículas de melanina estudadas.

Quadro 3 – Composição dos elementos químicos presente em amostras de melanina da Família *Trichosporonaceae* e *C. neoformans*.

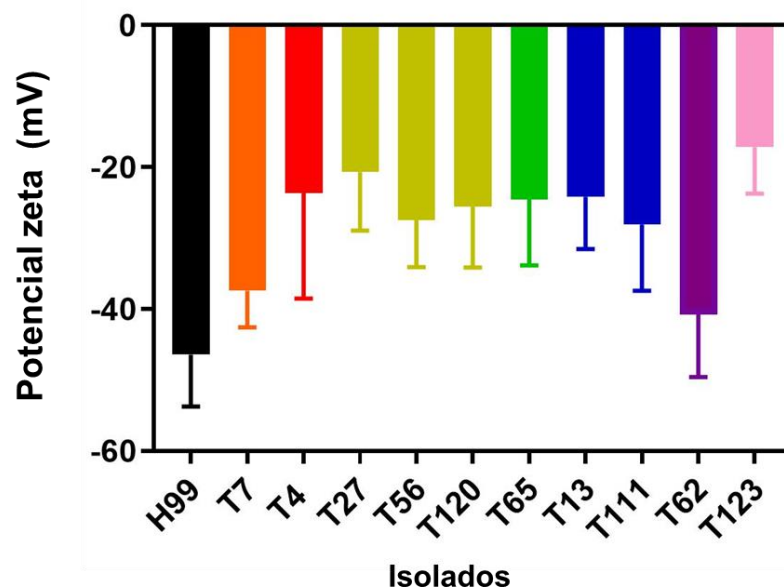
Amostra	C Carbono	O Oxigênio	Na Sódio	Mg Magnésio	Al Alumínio	Si Silício	P Fósforo	Cl Cloro	K Potássio	Ba Bário	Ca Calcio	Ti Titânio	V Vanádio	Fe Ferro	Cu Cobre	Zn Zinco
<i>C. neoformans</i>	30,32	19,17	9,57	0,09	1,65	20,64	0	3,72	3,55	0	0,04	1,42	0	0,09	0	2,53
<i>T. japonicum</i>	12,92	29,13	10,94	0	2	24,82	0	3,1	4,78	0	0	1,83	0,14	0	0	0
<i>T. asahii</i>	47,91	16,38	9,95	0,41	0,94	7,48	3,15	9,18	2,24	0	0,2	0,68	0	0,08	0,07	1,34
<i>A. montevidense</i>	22,08	22,12	10,43	0	1,79	20,53	0	4,67	4	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. inkin</i>	7,63	31,29	11,58	0	2,16	26,68	0	6,08	5,57	0	0	1,82	0	0	0	0
<i>T. inkin</i>	22,61	38,44	14,33	0	0,74	9,5	7,3	1,74	4,5	0	0,03	0	0	0,09	0,11	0,62
<i>C. debeurmannianum</i>	40,21	19,38	7,53	0	0	17,09	0	2,34	4,43	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. faecale</i>	43,35	34,89	13,97	0	0	1,83	2,94	2,1	0,93	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. montevidense</i>	38,55	33,07	5,94	0	0	3,94	0	5,37	0,7	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. inkin</i>	40,21	28,86	13,7	0,53	0,53	1,75	2,81	3,26	1,06	0	0,14	0	0	0,2	0,25	0,24
<i>C. arboriformis</i>	13,71	32,85	12,34	0	1,65	24,62	5,48	0	5,05	4,3	0	0	0	0	0	0

Legenda: Análise de composição realizada por Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de raios X por dispersão em energia, no microscópio de varredura FEI Quanta FEG 450 with Apollo X – EDAX (Mag 10.000 X).

5.5.4 Potencial zeta e condutância

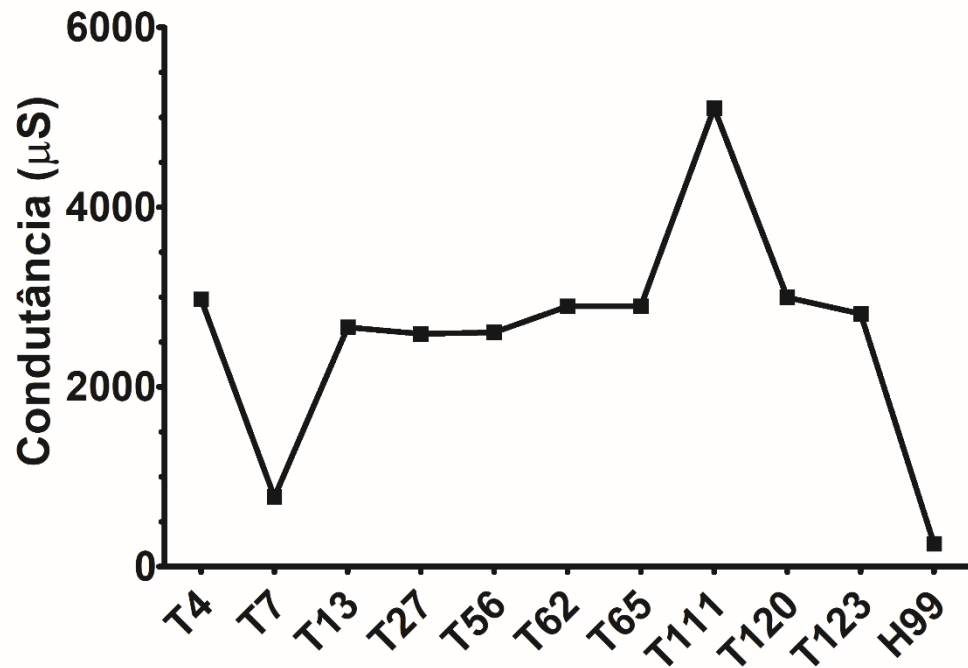
Todas as partículas de melanina dos membros da Família *Trichosporonaceae* demonstraram possuir potencial zeta eletronegativo com médias variando de -17,17 a -46,31 mV. O potencial zeta de melanina produzido pelo controle positivo do estudo, *C. neoformans*, foi menor que o de todos os membros da Família *Trichosporonaceae* ($p < 0,05$); esta diferença somente não foi significativa na espécie *C. debeurmaniannum*. Além disso, o potencial zeta da melanina produzida por *T. asahii* foi mais eletronegativo que de outras espécies da Família *Trichosporonaceae*, exceto *C. debeurmaniannum*. Os dados do potencial zeta estão expressos na figura 19.

Figura 19 – Potencial zeta de amostras de melanina de isolados da Família *Trichosporonaceae* e *C. neoformans*



Legenda: Comparação dos potenciais zeta das amostras de *Trichosporon* spp. e *C. neoformans*. Cores das barras: *C. neoformans*; preto (H99); *T. asahii*; laranja (T7); *T. japonicum*; vermelho (T4); *T. inkin*; amarelo mostarda (T27, T56, T120); *T. faecale*; verde (T65); *A. montevidense*; azul (T13, T111); *C. debeurmaniannum*; roxo (T62) e *C. arboriformis*; rosa (T123).

Assim como no potencial zeta, o isolado da espécie *T. asahii* apresentou baixo valor de condutância quando comparado aos outros membros da Família *Trichosporonaceae* (Figura 20). O potencial zeta e a condutividade foram significativamente diferentes nas espécies da Família *Trichosporonaceae* quando comparadas a *C. neoformans* (H99).

Figura 20 – Condutância das amostras da Família *Trichosporonaceae* e *C. neoformans*

Legenda: Valores da condutância elétrica apresentada por partículas de melanina em isolados da Família *Trichosporonaceae* e *C. neoformans*. *C. neoformans* (H99); *T. asahii* (T7); *T. japonicum* (T4); *T. inkin* (T27, T56, T120); *T. faecale* (T65); *A. montevidense* (T13, T111); *C. debeurmaninaum* (T62) e *C. arboriformis* (T123).

6 DISCUSSÃO

Casos de infecções invasivas por espécies da Família *Trichosporonaceae* estão cada vez mais frequentes. Atualmente é a segunda principal causa de infecções da corrente sanguínea por leveduras após *Candida* spp., principalmente na população imunossuprimida (RAMIREZ; MONCADA 2019). Também é a segunda causa mais comum em pacientes com doenças hematológicas malignas. Dentre as principais espécies desta família importantes para as infecções invasivas temos *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. inkin* e *T. ovoides* (FLEMMING; WALSH; ANAÏSSIE; 2002). Em nosso estudo, *T. asahii* e *T. inkin* foram as espécies mais frequentes, corroborando o estudo citado. Contudo, não tivemos isolados de *T. asteroides* e apenas um isolado foi identificado como *T. ovoides*.

Acreditamos que esta divergência quanto à espécie de *T. asteroides* possa ser devido à similaridade entre as espécies de *T. asteroides* e *T. japonicum* (COLOMBO, PADOVAN, CHAVES, 2011). Já que *T. japonicum* foi descrito pouco antes do trabalho de Flemming (2002) (SUGITA; NAKASE; 1998). Desta forma, isolados de *T. asteroides* podem ter sido erroneamente classificados. Assim, é possível que a importância da espécie *T. japonicum* possa ter sido mascarada no contexto da infecção invasiva.

A identificação das espécies da Família *Trichosporonaceae* baseada em provas fenotípicas, geram resultados inconsistentes (CHALLAPILLA et al., 2019). Alguns métodos morfológicos e automatizados já foram relatados, porém possuem bancos de dados incompletos, que não contemplam as atualizações taxonômicas, dificultando a precisão da identificação (COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011). Tendo em vista esta problemática, a identificação molecular é sugerida como uma boa ferramenta para identificar os fungos da Família *Trichosporonaceae* (SUGITA et al., 2002). Em vista disto, a identificação molecular foi a opção de escolha para identificação em nível de espécie dos isolados deste estudo.

Quanto à identificação molecular das espécies de *Trichosporonaceae*, diferentes regiões do genoma são utilizadas. Alguns autores sugerem a utilização do sequenciamento da região IGS (SUGITA et al., 2002; HAZIROLAN; KOÇAK; KARAGOZ, 2018) para identificação das espécies. Rastogi e colaboradores em 2016 realizaram uma análise molecular comparando o sequenciamento das regiões ITS e IGS ressaltando que a região IGS discriminou as principais espécies

causadoras da tricosporonose. O sequenciamento da região IGS é útil para distinguir espécies filogeneticamente relacionadas (SUGITA et al., 2002; TUDELA et al., 2005). Entretanto, é uma região que apresenta alto polimorfismo, com variações entre uma mesma espécie. E quando as sequências são comparadas com as depositadas nos bancos de dados, é possível que não haja similaridade de 100% (GUO et al., 2011).

Em nosso estudo a análise molecular do sequenciamento da subunidade D1/D2 da região 28S do rDNA (TAJ-ALDEEN et al., 2009; ZENG et al., 2009; CHOWDHARY et al., 2014) permitiu a identificação de todos os isolados. De fato, acreditamos que tanto a região IGS quanto D1/D2 sejam úteis para distinguir as espécies da Família *Trichosporonaceae*, tendo algumas limitações para distinção de espécies estreitamente próximas, como *T. asteroides* e *T. japonicum* (COLOMBO, PADOVAN, CHAVES, 2011). Em nosso estudo, tivemos dificuldade de identificar os isolados de *T. japonicum*, pois nos bancos de dados, as sequências obtidas por nós possuíam 100% de similaridade com sequências depositadas de ambas as espécies. Acreditamos que este fato pode estar relacionado com a má qualidade das sequências depositadas nos bancos de dados (PFALLER et al., 2012) ou com a identificação errônea do fungo, principalmente no caso de sequências mais antigas presentes nas bases de dados.

Em muitos casos, as espécies de *T. asahii* causam infecção fatal, principalmente em pacientes neutropênicos (WALSH et al., 1993). Chamamos a atenção em nosso estudo para o predomínio de isolados clínicos identificados como *T. asahii*, o que corrobora os achados de Chagas-Neto et al. (2009) no Brasil, Ruan; Chien e Hsueh (2009) em Taiwan e Guo et al. (2019) na China. Portanto, existe um predomínio epidemiológico de *T. asahii* quando comparado com os outros agentes da tricosporonose. Esse predomínio pode ser relacionado a aspectos de virulência que essa espécie possui.

Com relação às outras espécies não-*asahii*, em estudo de Taverna e colaboradores (2014) realizado na Argentina, foram identificados 41 isolados de *Trichosporon* sp. Dentre as espécies não-*asahii*, destacam-se *T. inkin* (7,31%); *A. montevidense* (7,31%); *T. faecale* (4,87%) e *T. dermatitis* (2,4%). Com exceção da espécie *T. dermatitis*, todas as demais espécies foram identificadas no presente estudo com proporções semelhantes (TAVERNA et al., 2014).

Em estudo de Francisco e colaboradores (2019) foi realizado levantamento das espécies causadoras de tricosporonose em centros médicos no Brasil, entre os anos de 2008 a 2018. As espécies mais isoladas foram, respectivamente, *T. asahii*, *T. inkin*, *T. faecale*, *T. asteroides* e *T. coremiiforme*. Reconhecendo e corroborando com o predomínio epidemiológico da espécie *T. asahii*, estudos exclusivos de espécies não-*asahii* são necessários para o entendimento epidemiológico destas outras espécies causadoras de tricosporonose, bem como as implicações clínicas relacionadas aos aspectos de virulência das espécies menos frequentes.

O uso de fontes alternativas de carbono é de suma importância para a sobrevivência dos micro-organismos e é um aspecto bem estudado para o gênero *Candida* (MIRAMÓN, LORENZ 2017; VESELY et al. 2017). Nossos resultados inferem que de acordo com a fonte de carbono oferecida ao fungo, o crescimento de *Trichosporon spp.*, e de algumas espécies patogênicas de gêneros relacionados, sofrem alterações. *T. asahii*, *T. japonicum*, *C. debeurmanniaum* e *C. arboriformis*, quando crescem em N-acetilglicosamina induzem a formação de hifas, assim como foi visto em estudos de Vesely e colaboradores (2017). Além disto, alguns isolados de *T. asahii* e *T. japonicum* também sofreram alterações e formaram hifas e pseudo-hifas em meio acrescido com lactato.

A morfogênese hifal é característica chave na virulência de *C. albicans*, pois auxilia na invasão e colonização dos tecidos do hospedeiro. Além disso, como o crescimento da hifa é ativado nos macrófagos, danifica os mesmos e induz à piroptose, contribuindo para o escape do sistema imune (VESELY et al., 2017). Baseado nessa premissa, os isolados de *T. asahii* e *T. japonicum* parecem ter uma maior capacidade de invadir e assim causar infecções disseminadas. Em amostras de hemocultura de pacientes com tricosporonose as espécies de *T. asahii* e *T. asteroides* são mais comumente isoladas (FRANCISCO et al., 2019). Em vista disto, nossos resultados reforçam a capacidade dessas duas espécies de invasão e disseminação.

ENE et al., (2012) sugerem que a mudança da fonte de carbono altera a virulência de *C. albicans*. Foi comparado o isolado frente à glicose e ao lactato; os seus resultados mostram diversas alterações na composição da parede celular do fungo e resistência a fármacos quando lactato é assimilado. Em nossos resultados, observou-se tanto diferença na curva de crescimento, como na micromorfologia dos

isolados de *T. asahi* e *T. japonicum* na presença do lactato. Isolados de *T. asahii* mostraram-se bons assimiladores das três fontes de carbono estudadas, quando comparados às outras espécies do estudo, sendo elas glicose, lactato e N-acetilglicosamina.

Nas curvas de crescimento dos isolados frente ao lactato, foi observado um melhor crescimento das espécies de *T. asahii* e *T. faecale*. O trabalho de Hernandez, Bellomo e Bakker (2018) relata que pacientes com níveis aumentados de lactato em exames bioquímicos, geralmente estão relacionados à disfunção circulatória. É sabido que a tricosporonose invasiva acomete principalmente pacientes hematológicos, e a espécie *T. asahii* possui relevância e prevalência neste contexto de infecções invasivas (PADOVAN et al., 2019). Acreditamos que, possa existir correlação destes dados com os resultados do nosso estudo, tendo em vista o bom crescimento de *T. asahii* frente ao lactato.

Recentemente, Francisco e colaboradores (2019), realizaram um estudo sobre a distribuição de espécies do gênero *Trichosporon*. Isolados de *T. faecale* foram considerados a segunda ou terceira espécie mais isolada causando infecção, dependendo do espécime clínico. Em amostras respiratórias e em pontas de cateter foi a segunda espécie mais frequente, atrás apenas de *T. asahii*. Tendo em vista o bom crescimento destas duas espécies frente ao lactato no presente estudo e a prevalência no trabalho citado anteriormente, chamamos a atenção para o possível potencial em causar infecção da espécie de *T. faecale*.

A capacidade da espécie *T. asahii* em ter melhor crescimento nas duas fontes de carbono alternativas, lactato e N-acetilglicosamina, é de suma importância no parasitismo. Já que a atuação das bactérias do intestino humano contribui para a digestão de carboidratos complexos e produzem uma variedade de metabólitos, dentre eles, o lactato, que é particularmente abundante. Fluidos salivares, vaginais e o sangue também são nutricionalmente ricos deste composto. Outras fontes de carbono encontradas no hospedeiro inclui o abundante amino-açúcar N-acetilglicosamina, um constituinte comum de proteínas glicosiladas do hospedeiro (MIRAMÓN; LORENZ, 2017). A eficácia da capacidade de assimilação destes açúcares é uma vantagem para a espécie *T. asahii*, tendo em vista que no parasitismo há restrição de fontes nutricionais usuais ao patógeno (MIRAMÓN; LORENZ, 2017). O bom crescimento desta espécie frente ao lactato pode justificar o porquê de *T. asahii* ser predominante em infecções invasivas, já que o sangue é rico

deste composto, principalmente em pacientes com doenças hematológicas (HERNANDEZ; BELLOMO; BAKKER, 2018).

Segundo Ichikawa e colaboradores (2003), *T. asahii* apresenta um potencial de mudanças fenotípicas similar ao das espécies de *Candida* (DOGEN et al., 2017; ZHENG et al., 2017; YUE et al., 2018; FRAZER, HERNDAY, BENETT 2019). Acredita-se que essa mudança de fenótipo seja um importante fator de virulência, facilitando o escape do fungo do sistema imune do hospedeiro (YUE et al., 2018). Em nossos estudos, as espécies de *T. asahii*, e, em menor proporção, *T. japonicum* e *T. inkin* apresentaram potencial de mudanças fenotípicas. Vale ressaltar que estas espécies estão entre as mais isoladas causando tricosporonose.

A capacidade de diferenciação macroscópica também foi avaliada por Bentubo (2008). Em seu estudo, foi constatado que *T. asahii*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* quando submetidas à temperatura de 37 °C tendem a apresentar uma textura mais lisa, com aspecto úmido e brilhante. Esses dados corroboram os resultados deste estudo, nossos isolados quando incubados a 37 °C também apresentaram predominância de colônias de aspecto liso.

Os isolados que apresentaram textura rugosa foram *T. asahii*, *T. inkin* e *T. japonicum*, espécies essas mais prevalentes epidemiologicamente (FRANCISCO et al., 2019). Acreditamos que este crescimento rugoso sugere a presença de hifas que podem facilitar a invasão do fungo nos tecidos do hospedeiro (VESELY et al., 2017).

É sabido que *T. asahii* possui algumas características em comum com o gênero *Cryptococcus*, dentre elas, a produção de um polissacarídeo fúngico, a GXM (ZIMBRES et al., 2018). A reatividade cruzada do antígeno de *Trichosporon* sp. com o polissacarídeo capsular de *Cryptococcus* sp. tem sido relatada em pacientes com infecção por *Trichosporon* sp. há muito tempo (LIAO et al., 2012).

Nas espécies de *Trichosporon* spp. a maioria dos estudos relata a produção de GXM por *T. asahii* (ICHIKAWA et al., 2001; KARASHIMA et al., 2002; FONSECA et al., 2009), e mais recentemente, no trabalho de ZIMBRES et al. (2018), foi comprovada a produção deste polissacarídeo por *T. mucoides*. Os autores relatam que a presença de GXM em espécies de *Trichosporon* não-*asahii* ainda é indeterminada (ZIMBRES et al., 2018). Nossos resultados evidenciam que as espécies *T. inkin*, *A. montevideense*, *T. japonicum*, *T. faecale*, *C. debeurmannianum*, *T. ovoides* e *C. arboriformis* também são produtoras deste polissacarídeo, o que foi

confirmado através da aglutinação em partículas de látex contendo anticorpo anti-GXM.

Alguns isolados de *T. asahii*, *T. inkin* e *T. faecale* mostraram-se bons produtores deste polissacarídeo. Entretanto, quando foi realizada a comparação da dosagem de carboidratos secretados em espécies de *T. asahii* e não-*asahii* não houve diferenças estatisticamente significativas. Como dito anteriormente, estudos sobre a produção de GXM em espécies não-*asahii* ainda são escassos, tornando-se necessários mais estudos a fim de analisar a produção deste carboidrato em espécies não-*asahii*.

Poucos trabalhos relatam sobre produção de melanina nas espécies da Família *Trichosporonaceae*. São necessários mais estudos para que sejam definidas as características das melaninas e a implicação clínica da produção deste pigmento. Isto é importante, tanto para o conhecimento em *T. asahii*, quanto para a avaliação das demais espécies capazes de causar infecção em humanos.

Sabendo-se que a melanina tem um papel importante na proteção contra estresse ambiental, oxidantes derivados de nitrogênio e fármacos antifúngicos (TABORDA et al., 2008), Figueiredo-Carvalho e colaboradores (2014) relatam em seu estudo que o gênero *Trichosporon* tem a capacidade de produzir melanina utilizando a L-DOPA como precursor. Baseado nessa premissa, nosso estudo verificou que alguns isolados de *T. asahii* apresentaram uma boa produção deste pigmento quando avaliado através de análise por densidade óptica. Entretanto, há isolados de *T. asahii* que são fracos produtores de melanina. No trabalho de Bentubo (2008) foi avaliada a produção de melanina em dois isolados de *T. asahii*; em que um deles foi observado um discreto enegrecimento e em outro não houve enegrecimento. Nossa amostragem também apresentou alguns isolados com baixa síntese de melanina na presença de L-DOPA, o que pode ter contribuído para que, de uma forma global, não fosse verificada diferença significativa na produção deste pigmento entre *T. asahii* e espécies não-*asahii*.

Quanto à composição química da melanina produzida pelas diferentes espécies incluídas no presente estudo, foram encontradas maiores concentrações de carbono, oxigênio e sódio, corroborando os achados de Mbonyiryivuze e colaboradores (2015). No trabalho destes pesquisadores foi analisada a morfologia e composição da melanina do choco comum (*Sepia officinalis*) onde, além de altas concentrações dos compostos citados anteriormente, também foram descritas altas

concentrações de cloro, o que pode ser explicado pelo fato do choco ser um molusco marinho.

As melaninas fúngicas possuem a capacidade de se ligar a vários metais, sendo feita a bioabsorção de metais a partir de rochas e outros nichos ambientais (CORDERO; CASADEVALL, 2017). As melaninas possuem muitos potenciais locais de ligação de íons metálicos, sendo conhecidas pela alta afinidade para uma variedade de metais potencialmente tóxicos para os fungos (RIVERA; CASADEVALL, 2001). Em nosso estudo, a composição da melanina de dois isolados nos chamou atenção por apresentarem bário e vanádio, que são elementos tóxicos e presentes no ambiente (LAZARIDIS; JEKEL; ZOUBOULIS, 2003; MENZIE et al., 2008). O vanádio já foi descrito como causador de efeitos adversos em crianças (CAO et al., 2016). Sua toxicidade é comparável à do mercúrio, chumbo e arsênico (LAZARIDIS; JEKEL; ZOUBOULIS, 2003).

Já foi relatado o papel complexo dos fungos no ciclo biogeoquímico do vanádio. Nele, os fungos basidiomicetos são capazes de solubilizar vanádio de sólidos minerais e imobilizar o vanádio dissolvido através da captação e acumulação em micélios ou pela formação de cristais extracelulares (XU et al., 2019). Este elemento químico foi constatado presente na composição da melanina do isolado *T. japonicum*. Como basidiomicetos, dentro do qual se encontra a Família *Trichosporonaceae*, produzem diversos tipos de melanina (TOLEDO et al., 2017), nosso resultado sugere um possível papel desse pigmento no ciclo do vanádio.

Além de participar do ciclo geoquímico do vanádio, os micro-organismos também participam do ciclo do bário (DEHAIRS; CHESSELET; JEDWAB; 1980). Alguns grupos de fungos apresentam alta toxicidade, como é o caso do *Trogia venenata* e uma das hipóteses para tamanha toxicidade são as elevadas concentrações de bário, pois estes cogumelos são capazes de acumular este metal (STONE 2010). Apenas a espécie de *C. arboriformis* apresentou este elemento. Estes dois compostos tóxicos citados anteriormente podem estar envolvidos na proteção do fungo no ambiente.

Nossos resultados quanto aos elementos da composição de melanina das espécies de *T. japonicum* e *C. arboriformis* podem levar a estudos futuros a fim de avaliar se estes metais interferem na patogenicidade destes fungos. E se o fato da composição ser diferente dentre as espécies estudadas pode ter alguma relação com susceptibilidade e virulência dos isolados.

As espécies consideradas mais patogênicas do experimento de composição química da melanina, *T. asahii*, *T. inkin* e *C. neoformans* foram as únicas que apresentaram o elemento ferro na composição de suas melaninas. Em parasitismo a disponibilidade do ferro é limitada, pois este elemento está presente em proteínas do hospedeiro. Então, patógenos fúngicos empregam diferentes mecanismos para aquisição do ferro (SAIKIA et al., 2014).

É fundamental a aquisição do ferro em leveduras de *C. neoformans*, pois auxilia o patógeno a causar infecção em hospedeiros vertebrados e a falta de aquisição do ferro atenua a virulência (SAIKIA et al., 2014). Está descrito que a captação de ferro é alvo importante para novos medicamentos antimicrobianos e candidatos ao desenvolvimento de vacinas (KRONSTAD; HU; JUNG, 2013).

O ferro regula a elaboração dos principais fatores de virulência em *C. neoformans*, incluindo o pigmento melanina e a cápsula de polissacarídeo (KRONSTAD; HU; JUNG, 2013). Acreditamos que a capacidade de aquisição de ferro nos isolados de *T. asahii* e *T. inkin* deste estudo, possa ser fundamental para sua virulência. Podendo justificar o predomínio destas espécies como as principais causadoras de infecção quando comparadas aos outros membros da Família *Trichosporonaceae* (FRANCISCO et al., 2019).

Está descrito que o potencial zeta da melanina de *Cryptococcus* é negativo e que esta eletronegatividade pode estar relacionada com a virulência do fungo, atuando na resistência contra fagocitose (NOSANCHUK; CASADEVALL, 1997). Nossa cepa controle H99 (*C. neoformans*) apresentou carga negativa maior quando comparada aos isolados do nosso estudo. Acreditamos que se deu ao fato desta ser uma cepa amplamente empregada em ensaios de virulência. Além disso, *C. neoformans* é mais frequente como agente de infecções do que os membros da Família *Trichosporonaceae*, podendo causar inclusive infecção em indivíduos imunocompetentes (PINHEIRO et al., 2019). Um dos fatores que pode contribuir pra isso é a maior eletronegatividade conferida pela melanina de *C. neoformans*.

As espécies de *T. asahii* e *C. debeurmannianum* dentro das espécies analisadas neste trabalho foram as que apresentaram o potencial zeta mais eletronegativo. Quanto à espécie de *T. asahii* já tem sido descrito que possivelmente seja mais virulenta por ser mais frequente causando tricosporonose (PADOVAN et al, 2019). Tem sido relatado que o *T. asahii* é mais virulento do que as outras espécies de *Trichosporon* spp. tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. Estudos

realizados com modelos de *Galleria mellonella* e em murinos evidenciam a importância desta espécie na tricosporonose (MARINÉ et al., 2015b). Já a espécie *C. debeurmannianum* não é frequentemente descrita como importante causadora de tricosporonose (NATH et al., 2017). Nossos resultados sugerem que a eletronegatividade da melanina pode conferir algum potencial patogênico a essa espécie, porém a ausência de outros fatores de virulência, como alterações fenotípicas, elevada filamentação e baixo potencial de plasticidade metabólica impedem que essa espécie possa ter um papel mais importante em quadros clínicos humanos.

Quanto à condutância das partículas de melanina das diferentes espécies analisadas, a espécie do *T. asahii* demonstrou possuir a menor condutância, esta espécie foi que apresentou o valor mais próximo do controle positivo *C. neoformans* (H99) dentre os membros da Família *Trichosporonaceae* deste estudo.

Os resultados deste estudo contribuem para a epidemiologia da tricosporonose e corroboram com a literatura atual, sobre o predomínio de *T. asahii* em isolados clínicos. Esta espécie, dentro dos fatores de virulência estudados por nós, parece crescer melhor na presença de fontes alternativas de carbono, o que pode conferir uma vantagem adaptativa no hospedeiro humano.

Vale ressaltar o pioneirismo quanto aos estudos realizados sobre a composição e carga elétrica das partículas de melanina. Futuros estudos comparando a patogenicidade das espécies de *T. asahii* e não-*asahii* são de suma importância para avaliar o perfil clínico e epidemiológico da tricosporonose.

7 CONCLUSÕES

- *T. asahii* predomina, dentro da Família *Trichosporonaceae*, em amostras clínicas deste estudo, isoladas de pacientes do Rio de Janeiro/ Brasil, assim como ocorre em outras localidades do mundo. Seguida das espécies *T. inkin*, *A. montevideense*, *T. faecale*, *T. japonicum*, *T. ovoides*, *C. arboriformis* e *C. debeurmannianum*.
- *T. asahii* apresenta melhor crescimento em fontes alternativas de carbono encontradas durante o parasitismo, como lactato e N-acetilglicosamina, do que outras espécies da Família *Trichosporonaceae*. Além disso, *T. asahii* e *T. japonicum* apresenta capacidade de filamentação quando cresce na presença dessas duas fontes de carbono.
- *T. asahii*, *T. japonicum* e *T. inkin* são espécies que possuem potencial para realizar mudanças fenotípicas dentro da Família *Trichosporonaceae*.
- As espécies do estudo foram capazes de produzir pigmento compatível com melanina. O pigmento produzido varia em composição química e em eletronegatividade entre as diferentes espécies da Família *Trichosporonaceae*.
- Todas as espécies estudadas possuem a capacidade de secretar carboidrato imunologicamente relacionado à glucuronoxilomanana de *Cryptococcus neoformans*. A quantidade de carboidratos secretados varia entre as cepas, mas não entre as diferentes espécies estudadas.
- Dentre os fenótipos associados à virulência avaliados nesse estudo, a plasticidade metabólica e a capacidade de realizar mudanças fenotípicas foram os mais diferenciados em *T. asahii* com relação a outras espécies da Família *Trichosporonaceae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-JÚNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* Infection: a Systematic Review on a Re-emerging Fungal Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1629, p. eCollection, out. 2016.
- ALMEIDA-JÚNIOR, J. **Padronização da espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de cepas em *Trichosporon* spp. de importância médica.** 2014. 93f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Cell-free antigens of *Sporothrix brasiliensis*: antigenic diversity and application in an immunoblot assay. **Mycoses**, v. 55, n. 6, p. 467-475, nov. 2012.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **Plos one**, v. 11, n. 3, p. e015279, mar. 2016.
- ARABATZIS, M. et al. Sequence-based identification, genotyping and EUCAST antifungal susceptibilities of *Trichosporon* clinical isolates from Greece. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, n. 8, p. 777- 783, ago. 2014.
- ARENDRUP, M. C. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. **Danish Medical Journal**, v. 60, n. 11, p. B4698, nov. 2013.
- ARENDRUP, M. C. et al. ESCMID† and ECMM‡ joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 3, p. 76-98, abr. 2014.
- BASU, S. et al. Multidrug-resistant *Trichosporon*: an unusual fungal sepsis in preterm neonates. **Pathog Glob Health**, v. 109, n. 4, p. 202-206, jun. 2015.
- BENTUBO, H. **Leveduras do gênero *Trichosporon*: aspectos ecológicos, caracterização laboratorial, fatores associados à virulência e suscetibilidade a antifúngicos.** 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BENTUBO, H.; GAMBALE, W.; FISCHMAN, O.; Caracterização laboratorial e comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*. **Revista Brasileira Pesquisa Saúde**, v. 15, n. 1, p. 69-74, jan-mar. 2013.
- BENTUBO, H. D.; 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. 337, p. eCollection 2014. jul. 2014.

BONAVENTURA, G. et al. Biofilm Formation by the Emerging Fungal Pathogen *Trichosporon asahii*: Development, Architecture, and Antifungal Resistance. **American Society for Microbiology**, v. 50, n. 10, p. 3269-3276, out. 2006.

BONIFAZ, A. et al. White Piedra: Clinical, Mycological, and Therapeutic Experience of Fourteen Cases. **Skin Appendage Disord**, v. 5, n. 3, p. 135-141, abr. 2019.

BRITO-SANTOS, F. **Identificação e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de cepas do gênero *Trichosporon spp.*** 2009. 51f. Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Estácio de Sá como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico. Rio de Janeiro, 2009.

BRYAN, LK. et al. Meningoencephalitis in a Dog Due to *Trichosporon montevidense*. **J Comp Pathol**, v. 151, n. 2-3, p. 157-161, ago-out. 2014.

CAIRA, M. et al. Uncommon yeast infections in hematological patients: from diagnosis to treatment. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 11, p. 1067-1075, nov. 2011.

CAMARGO, Z. et al. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J Med Vet Mycol**, v. 29, v. 1, p. 31-38, jan. 1991.

CAO, S. Z. et al. Health risks of children's cumulative and aggregative exposure to metals and metalloids in a typical urban environment in China. **Chemosphere**, v. 147, p. 404-411, mar. 2016.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 354-358, ago. 2000.

CASTANO, G.; MADA, P. **Trichosporonosis**. StatPearls. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482477/>>. Acesso em: 28 de jun de 2018.

CBS. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome>. Acesso em: 08/08/2019.

CHAGAS-NETO, T. C. et al. Bloodstream infections due to *Trichosporon spp.*: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 1074-1081, abr. 2009.

CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the Genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166, n. 3, p. 121-132, set. 2008.

CHALLAPILLA, M. et al. *Trichosporon*–Blood Stream Infection. **Journal of The Association of Physicians of India**, v. 67, n. 3, p. 19-21, mar. 2019.

CHITASOMBAT, M. N. et al. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. **Journal of Infection**, v. 64, n. 1, p. 68-75, jan. 2012.

CHOWDHARY, A. et al. Molecular characterization and in vitro antifungal susceptibility of 80 clinical isolates of mucormycetes in Delhi, India. **Mycoses**, v. 57, n. 3, p. 97-107, dez. 2014.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 682-700, out. 2011.

CONG, L. et al. In Vitro Activity of Berberine Alone and in Combination with Antifungal Drugs Against Planktonic Forms and Biofilms of *Trichosporon asahii*. **Mycopathologia**, v. 182, n. 9-10, p. 829-837, out. 2017.

CORDERO, RJ; CASADEVALL, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. **Fungal Biol Rev**, v. 31, n. 2, p. 99-112, mar. 2017.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 46-53, 2001.

DA SILVA, MB. et al. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect**, v. 8, n.1, p. 197-205, jan. 2006.

DEHAIRS F.; CHESSELET R.; JEDWAB J. Discrete suspended particles of barite and the barium cycle in the open ocean. **Earth Planet Sci Lett**, v. 49, n. 2, p. 528-550, set. 1980.

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

DOGEN, A. et al. MTL genotypes, phenotypic switching, and susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* species group compared to *Lodderomyces elongisporus*. **Plos one**, v. 12, n. 8, p. e0182653, ago. 2017.

DUARTE-OLIVEIRA, C. et al. The cell biology of the *Trichosporon* - host interaction. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7:118, p. eCollection 2017, abr. 2017.

DUBOIS, et al. A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. **Nature**, v. 168, n. 4265, p. 167, jul. 1951.

ELLS, R. et al. Virulence of South African *Candida albicans* Strains Isolated from Different Clinical Samples. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 246-253, abr. 2014.

ENE, IV. et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 9, p. 1319-1335, set. 2012.

ESPIRITO SANTO. et al. Molecular Identification, Genotyping, Phenotyping, and Antifungal Susceptibilities of Medically Important *Trichosporon*, *Apiotrichum* and *Cutaneotrichosporon* Species. **Mycopathologia**, s11046-019-00407-x , nov. 2019.

EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. **Copenhagen, Denmark: European Committee on antimicrobial susceptibility Testing**, 2017.

FELL, J. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, maio 2000.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, jul. 1985.

FERRER, C. et al. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873-2879, ago. 2001.

FIGUEIREDO, D. **Identificação fenotípica e molecular, perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e detecção de glucuronoxilomanana em isolados clínicos de *Trichosporon***. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G. et al. L-Dihydroxyphenylalanine induces melanin production by members of the genus *Trichosporon*. **FEMS yeast research**, v. 14, n. 6, p. 988-991, set. 2014.

FISCHMAN, O. et al. *Trichosporon inkin*: An Uncommon Agent of Scalp White *Piedra*. Report of Four Cases in Brazilian Children. **Mycopathologia**, v. 178, p. 85–89, jan. 2014.

FLEMMING, RV.; WALSH, T; ANAISSIE, E. Emerging and less common fungal pathogens. **Infect Dis Clin North Am**, v. 16, n. 4, p. 915-933, dez. 2002

FONSECA, F. L. et al. Structural and functional properties of the *Trichosporon asahii* glucuronoxylomannan. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6-7, p. 496-505, jun-jul. 2009.

FRADIN, C. et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. **Mol Microbiol**, v. 56, n. 2, p. 397,415, abr. 2005.

FRANCISCO, EC. et al. Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. **Clin Microbiol Infect**, v. 25, n. 7, p. 909.e1-909.e5, jul. 2019.

FRAZER, C., HERNDAY, A. D., BENNETT, R. J. Monitoring phenotypic switching in *Candida albicans* and the use of Next-Gen fluorescence reporters. **Current Protocols in Microbiology**, v. 53, n. 1, p. e76, jun. 2019.

GARG, V. et al. Invasive trichosporonosis treated with voriconazole. **JAAD Case Reports**, v. 4, n. 4, p. 362-364, abr. 2018.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol**, v. 13, n. 1, p. 122-143, jan. 2000. 33.

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

GUO, L. et al. Three-locus identification, genotyping and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. **J. Clin. Microbiol**, v. 49, n. 11, p. 3805-3811, nov. 2011.

GUO, L. 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, jan. 2019.

HAMILTON, A.J.; GOMEZ, B.L. Melanins in fungal pathogens. **J. Med. Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 189-191, mar. 2002.

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

HENEBERG, P.; ŘEZÁČ, M. Two *Trichosporon* species isolated from Central-European mygalomorph spiders (*Araneae: Mygalomorphae*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 4, p. 713-721, abr. 2013.

HERNANDEZ, G.; BELLOMO, R.; BAKKER, J. The ten pitfalls of lactate clearance in sepsis. **Intensive Care Med**, v. 45, p. 82-85, maio 2018.

ICHIKAWA, T. et al. Structural studies of a cell wall polysaccharide of *Trichosporon asahii* containing antigen II. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 19, p. 5098-5106, out. 2001.

ICHIKAWA, T. et al. Phenotypic switching and beta-N-acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 4, p. 237-342, abr. 2004.

ITURRIETA-GONZÁLEZ IA, et al. Multiple Species of *Trichosporon* Produce Biofilms Highly Resistant to Triazoles and Amphotericin B. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109553, out. 2014.

KARASHIMA, R. et al. Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in *Trichosporon asahii* by repeated passage in mice. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 5, p. 423-432, maio 2002.

KONTOYIANNIS, D. P. et al. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: Risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, n. 8, p. 564-569, jul. 2004.

KRONSTAD, J.; HU, G.; JUNG, WH. An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol**, v. 21, n. 9, p. 457-465, set. 2013.

KUBIÇA, T. et al. In vitro activity of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Trichosporon asahii*. **Mycoses**, v. 62, n. 5, p. 428-433, maio 2019.

LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol**, v. 38, n. 2, p. 143-158, mar. 2003

LAZARIDIS, N.K; JEKEL M.; ZOUBOULIS, A. Removal of Cr(VI), Mo(VI), and V(V) ions from single metal aqueous solutions by sorption or nanofiltration. **Sep. Sci. Technol**, v. 38, n. 10, p. 2201-2219, jan. 2003.

LIAO, Y. et al. Serum glucuronoxylomannan may be more appropriate for the diagnosis and therapeutic monitoring of *Trichosporon* fungemia than serum β -d-glucan. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. e638, ago. 2012.

LIAO, Y. et al. Epidemiology and Outcome of *Trichosporon* Fungemia: A Review of 185 Reported Cases From 1975 to 2014. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. ofv141, set. 2015.

LIU, X. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **CBS**, v. 81, p. 85-147, jun. 2015.

LYMAN, C. A; WALSH, T. J. Phagocytosis of medically important yeasts by polymorphonuclear leukocytes. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1489-1493, abr. 1994.

LYMAN, C. A. et al. Detection and quantitation of the glucuronoxylomannan-like polysaccharide antigen from clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon biegelii* and implications for pathogenicity. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 1, p. 126-130, jan. 1995.

LONG, W; QI-MING, W. Molecular Phylogenetic Analysis of Ballistoconidium Forming Yeasts in Trichosporonales (Tremellomycetes): A Proposal for *Takashimella* gen. nov. and *Cryptotrichosporon tibetense* sp. nov.. **Plos one**, v. 10, n. 7, p. e0132653, jul. 2015.

LORENZ, MC; BENDER, J; FINK GR. Transcriptional Response of *Candida albicans* upon Internalization by Macrophages. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1076-1087, out. 2004.

MARINÉ, M. et al. On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by *Trichosporon* Species. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004982, jul. 2015a.

MARINÉ, M. et al. 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, mar. 2015b.

MASUKO, T. et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Science direct**, v. 339, n. 1, p. 69-72, abr. 2004.

MA, X. et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of culturable fungi in hair of *Ailuropoda melanoleuca*. **Chinese Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 344, nov. 2017.

MA, X. et al. Identification, genotyping, and pathogenicity of *Trichosporon* spp. Isolated from Giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). **BMC Microbiology**, v. 19:113, maio 2019.

MAGALHÃES, AR. et al. *Trichosporon* isolation from human ungueal infections: is there a pathogenic role? **An Bras Dermatol**, v. 91, n.2, p.173-179, abril 2016.

MBONYIRYIVUZE, A. et al. Morphological and chemical composition characterization of commercial sepia melanin. **American Journal of Nanomaterials**, v. 3, n. 1, p. 22-27, jun. 2015.

MENZIE C. A. et al. The importance of understanding the chemical form of a metal in the environment: the case of barium sulfate (barite). **Hum. Ecol. Risk Assess**, v. 14, n. 5, p. 974-991, set. 2008.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, fev. 2011.

MIRAMÓN, P; LORENZ, M. C. A feast for *Candida*: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006144, fev. 2017.

MONTOYA, A. M. et al. Genotyping, extracellular compounds, and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated from Mexican patients. **Medical Mycology**, v. 53, n. 5, p. 505-511, jun. 2015.

MONTOYA, A. M. et al. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 1, p. 22-26, jan. 2018.

NARDONI, S. et al. Cutaneous lesions due to *Trichosporon jirovecii* in a tortoise (*Testudo hermanni*) **Medical mycology case reports**, v. 18, p. 18-20, dez. 2017.

NATH, R. et al. *Cutaneotrichosporon (Trichosporon) debeurmannianum*: A Rare Yeast Isolated from Blood and Urine Samples. **Mycopathologia**, v. 183, n. 3, p. 585-590, jun. 2017.

NCBI. Disponível em: >https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome<. Acesso em 08/08/2019.

NOSANCHUK JD, CASADEVALL A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. **Infect Immun**, v. 65, n. 5, p. 1836-1841, maio 1997.

NOSANCHUK, J. D. et al. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. **Infect. Immun**, v. 70, n. 9, p. 5124-5131, set. 2002.

NOSANCHUK, J. D. et al. *Blastomyces dermatitidis* produces melanin in vitro and during infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 239, n. 1, p. 187-193, out. 2004.

NOSANCHUK JD, CASADEVALL A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n. 11, p. 3519-3528, nov. 2006.

PADOVAN, A. et al. Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: Triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 133, p. 103267, dez. 2019.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 117-123, jan. 2009.

PFALLER, M. A. et al. Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeasts and moulds in a global antifungal surveillance programme. **Mycopathologia**, v. 174, n. 4, p. 259-271, out. 2012.

PIEKARSKA, K. et al. Peroxisomal fatty acid beta-oxidation is not essential for virulence of *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 11, p. 1847-1856, nov. 2006.

PINHEIRO, M. et al. Cryptococcosis in the Amazon: A current overview and future perspectives. **Acta Trop**, v. 197, p. 105023, set. 2019.

PINTO, L. et al. Melanin particles isolated from the fungus *Fonsecaea pedrosoi* activates the human complement system. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 8, p. e180120, jun. 2018.

POLAK, A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. **Mycoses**, v. 33, n. 5, p. 215-224, maio 1990.

RAMIREZ, I.; MONCADA, D. Fatal Disseminated Infection by *Trichosporon asahii* Under Voriconazole Therapy in a Patient with Acute Myeloid Leukemia: A Review of Breakthrough Infections by *Trichosporon* spp. **Mycopathologia**, v. s11046-019-00416-w, dez. 2019.

RASTOGI, V. et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Trichosporon* isolates in India. **Mycoses**, v. 59, n. 8, p. 528-534, ago. 2016.

REVANKAR, S. G. et al. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 153-156, jan. 1998.

REX, J. H. et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 643-658, out. 2001.

RISSI DR, KIRBY KD, SANCHEZ S: Systemic *Trichosporon loubieri* infection in a cat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American**, v. 28, n. 3, p. 350-353, maio 2016.

RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. **Med Mycol**, v. 39, n. 4, p. 353-357, ago. 2001.

ROSELINO, AM. et al. An outbreak of scalp white piedra in a Brazilian children day care. **Rev Inst Med Trop**, v. 50, n. 5, p. 307-309. Set-Out, 2008.

RUAN, SY. CHIEN, JY. HSUEH, PR. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 1, p. e11-7, jul. 2009.

RUBIN-BEJERANO, I. et al. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 19, p. 11007-11012, set. 2003.

SAIKIA, S. et al. Role of ferric reductases in iron acquisition and virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 82, n. 2, p. 839-850, fev. 2014.

SARDI, J. et al. *Candida* Species: Current Epidemiology, Pathogenicity, Biofilm Formation, Natural Antifungal Products and New Therapeutic Options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, jan. 2013.

SILVA, N.; NERY, J.; DIAS, A. Aspartic Proteinases of *Candida* spp.: Role in Pathogenicity and Antifungal Resistance. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 1-11, jan. 2014.

SINGH, P. GHOSH, S. Attenuation of Virulence and Changes in Morphology in *Candida albicans* by Disruption of the N-Acetylglucosamine Catabolic Pathway. **Infect Immun**, v. 69, n. 12, p. 7898-7903, dez. 2001.

SINGH, A. et al. A Case of Scalp White Piedra Caused by *Trichosporon Ovoides*. **International Journal of Trichology**, v. 11, n. 3, p. 134-137, jun. 2019.

STONE R. Epidemiology. Will a midsummer's nightmare return? **Science**, v. 329, n. 5988, p. 132-134, jul. 2010.

SUGITA, T.; NAKASE, T. *Trichosporon japonicum* sp. nov. isolated from the air. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 4, p. 1425-1429, out. 1998.

SUGITA, T. et al. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1826-1830, maio 2002.

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

SUZUKI, K. et al. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. **Eur. J. Haematol**, v. 84, n. 5, p. 441-447, maio 2010.

TABORDA, V. B.; TABORDA, P. R. MCGINNIS, M. R. Constitutive melanin in the cell wall of etiologic agent of Lobo's disease. **Rev. Inst. Med. Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 9-12, jan-fev. 1999.

TABORDA, C. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, p. 331-339, abril-maio 2008.

TAJ-ALDEEN, S. et al. Molecular Identification and Susceptibility of *Trichosporon* Species Isolated from Clinical Specimens in Qatar: Isolation of *Trichosporon dohaense* Taj-Aldeen, Meis & Boekhout sp. Nov. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1791-1799, jun. 2009.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 30, p. 11030-11055, jul. 2004.

TANG, C. et al. Adaptability of Giant Panda to a New Habitat in Bifengxia, Yaan, Sichuan. **Chinese J Applied and Environ Biology**, v. 13, p. 686-690, out. 2007.

THÉRIZOL-FERLY, M. White piedra and *Trichosporon* species in equatorial Africa. I. History and clinical aspects: an analysis of 449 superficial inguinal specimens. **Mycoses**, v. 37, n. 7-8, p. 249-253, Jul-Ago. 1994.

TAVERNA, C. et al. Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. **Medical Mycology**, vol. 52, n. 4, p. 356-366, maio 2014.

TOLEDO, A. et al. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 99, p. 2-6, ago. 2017.

TSAI, M.S. et al. Susceptibilities to amphotericin B, fluconazole and voriconazole of *Trichosporon* clinical isolates. **Mycopathologia**, v. 174, n. 2, p. 121-130, ago. 2012.

TUDELA, JL. et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 10, p. 4026-4034, out. 2005.

VESELY, E. et al. N-acetylglucosamine Metabolism Promotes Survival of *Candida albicans* in Phagosome. **American Society for Microbiology**, v. 2, n. 5, p. e00357-17, set. 2017.

WALSH, T. J. et al. Trichosporonosis in Patients with Neoplastic Disease: **Medicine**, v. 65, n. 4, p. 268-279, jul. 1986.

WALSH, T. J. et al. Infections due to *Trichosporon* species: new concepts in mycology, pathogenesis, diagnosis and treatment. **Curr Top Med Mycol**, v. 5, p. 79-113, jan. 1993.

WALSH, T. J. et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clin. Microbiol. Infect**, v. 10, n.1, p. 48-66, mar. 2004.

WATSON, K.C; KALLICHURUM, S. Brain abscess due to *Trichosporon cutaneum*. **J Med Microbiol**, v. 3, n.1, p.191-193, fev. 1970.

WHEELER MH, BELL AA. Melanins and their importance in pathogenic fungi. **Curr Top Med Mycol**, v. 2, p. 338-387, 1988.

XU Y. et al. Vanadium-basidiomycete fungi interaction and its impact on vanadium biogeochemistry. **Environment International**, v. 130, p. 104891, set. 2019.

YAMADA-OKABE, T. et al. Identification and characterization of the genes for N-acetylglucosamine kinase and N-acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 8, p. 2498-2505, abr. 2001.

YUE, H. et al. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 188, nov. 2018.

YOUNGCHIM, S. et al. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. **J. Med. Microbiol**, v. 53, n. 3, p.175-181, mar. 2004.

ZAKIKHANY, K. et al. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 12, p. 2938-2954, dez. 2007.

ZARAGOZA, O. et al. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. **American Society for Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1563-1570, abr. 2011.

ZENG, J. et al. Identification of *Trichosporon* spp. Strains by Sequencing D1/D2 Region and Sub-typing by Sequencing Ribosomal Intergenic Spacer Region of Ribosomal DNA. **J Huazhong Univ Sci Technol**, v. 29, n. 5, p. 655-658, out. 2009.

ZHANG, Y. Study on Antioxidant Enzymatic Activities of *Trichosporon asahii*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 445-450, dez. 2016.

ZHENG, Q. et al. Environmental and genetic regulation of white-opaque switching in *Candida tropicalis*. **Molecular Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 999-1017, dez. 2017.

ZIMBRES, A. et al. A glucuronoxylomannan-like glycan produced by *Trichosporon mucoides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 121, p. 46-55, dez. 2018.

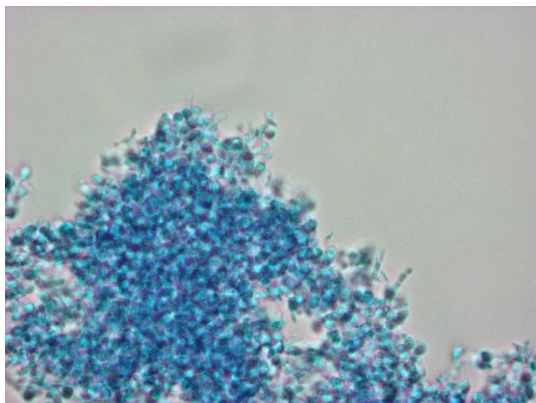
APÊNDICES

APÊNDICE A – Similaridade das sequências comparadas as depositadas no NCBI/GenBank

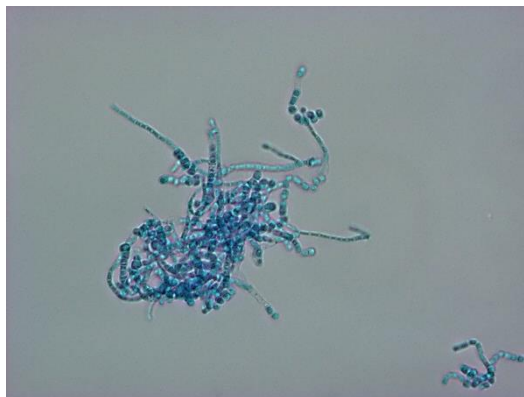
Nº do isolado	Espécie	Sequência	Porcentagem de homologia
T2	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872847	100%
T4	<i>Trichosporon japonicum</i>	MN872848	100%
T5	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872849	100%
T6	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872850	100%
T7	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872851	100%
T9	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872852	100%
T11	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872853	99,8%
T12	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872854	100%
T13	<i>Apiotrichum montevidense</i>	MN872855	100%
T14	<i>Apiotrichum montevidense</i>	MN872856	100%
T15	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872857	100%
T16	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872858	100%
T19	<i>Trichosporon japonicum</i>	MN872859	100%
T20	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872860	100%
T21	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872861	100%
T22	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872862	100%
T24	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872863	100%
T25	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872864	100%
T26	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872865	100%
T27	<i>Trichosporon inkin</i>	MN872866	99,8%
T28	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872867	100%
T29	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872868	100%
T31	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872869	100%
T33	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872870	100%
T35	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872871	100%
T36	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872872	100%
T37	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872873	100%

T38	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872874	100%
T42	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872875	100%
T44	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872876	100%
T45	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872877	100%
T46	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872878	100%
T47	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872879	100%
T50	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872880	100%
T52	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872881	100%
T53	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872882	100%
T54	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872883	100%
T55	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872884	100%
T56 (ATCC 18020)	<i>Trichosporon inkin</i>	KY109944.1	100%
T57	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872885	100%
T58	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872886	100%
T59	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872887	100%
T60	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872888	100%
T61	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872889	100%
T62	<i>Cutaneotrichosporon debeurmannianum</i>	MN872890	99,5%
T63	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872891	100%
T64	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872892	100%
T65	<i>Trichosporon faecale</i>	MN872893	100%
T66	<i>Trichosporon inkin</i>	MN872894	100%
T67	<i>Trichosporon faecale</i>	MN872895	100%
T68	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872896	100%
T69	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872897	100%
T70	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872898	100%
T71	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872899	100%
T72	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872900	100%
T76	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872901	100%
T80	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872902	100%

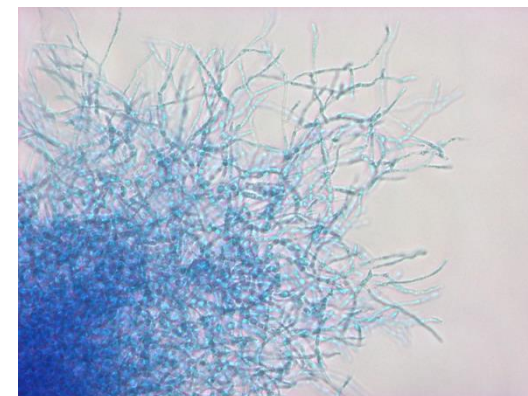
T81	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872903	100%
T84	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872904	100%
T85	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872905	100%
T86	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872906	100%
T88	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872907	100%
T89	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872908	100%
T97	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872909	100%
T98	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872910	100%
T99	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872911	100%
T101	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872912	100%
T103	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872913	100%
T104	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872914	100%
T105	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872915	100%
T106	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872916	100%
T107	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872917	100%
T108	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872918	100%
T109	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872919	100%
T111	<i>Apiotrichum montevideense</i>	MN872920	100%
T112	<i>Trichosporon ovoides</i>	MN872921	100%
T120	<i>Trichosporon inkin</i>	MN872922	100%
T121	<i>Trichosporon asahii</i>	MN872923	100%
T123	<i>Cutaneotrichosporon arboriformis</i>	MN872924	99,7%

APÊNDICE B – Diferentes micromorfologias das espécies *Trichosporonaceae* em glicose, lactato e N-acetilglicosamina*T. japonicum*

Glicose



Lactato



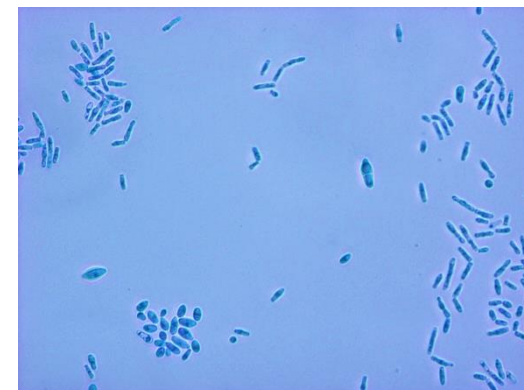
N-acetilglicosamina

A. montevidense

Glicose



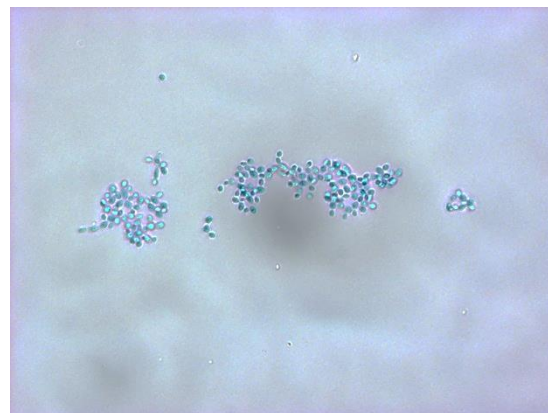
Lactato



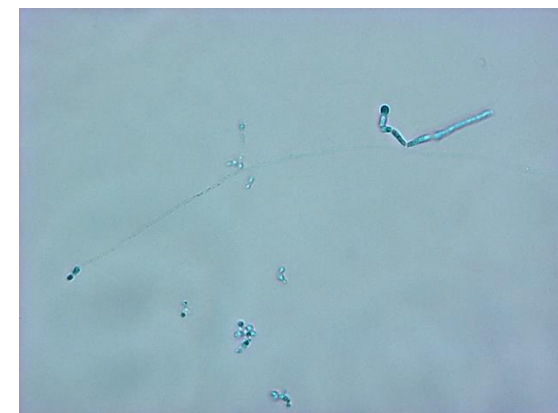
N-acetilglicosamina

C. debeurmanianum

Glucose



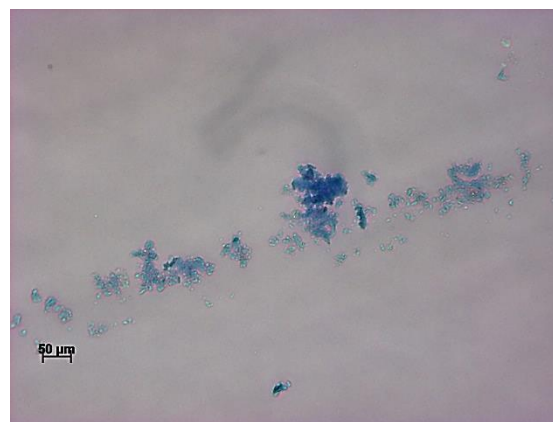
Lactato



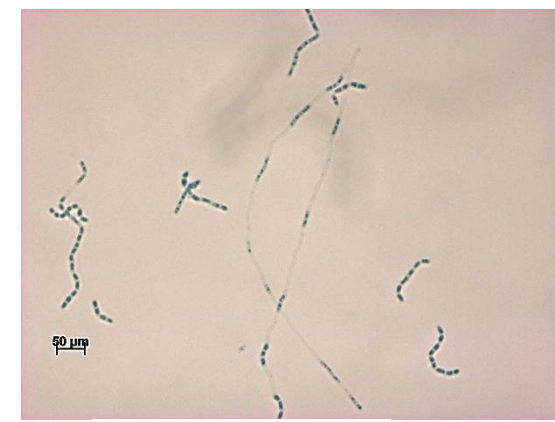
N-acetilglicosamina

T. faecale

Glucose

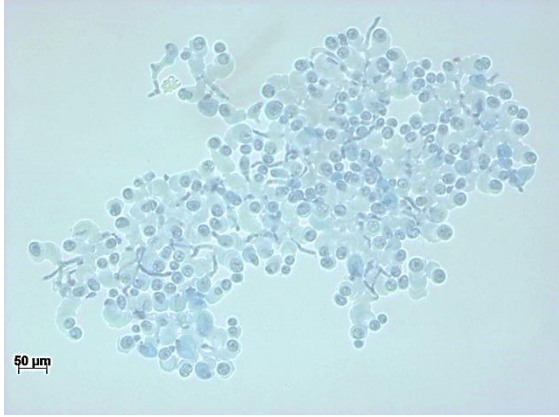


Lactato

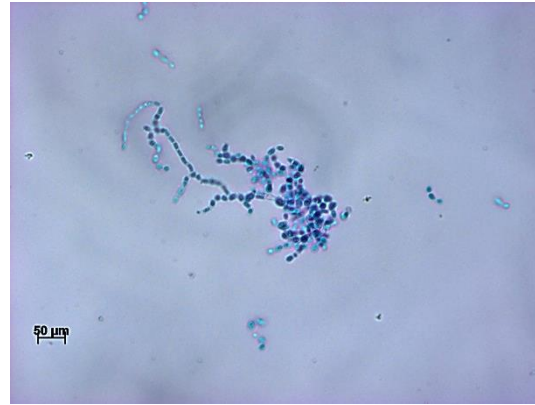


N-acetilglicosamina

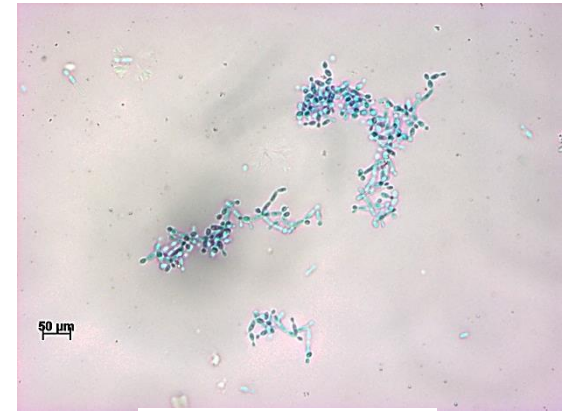
T. inkin



Glucose

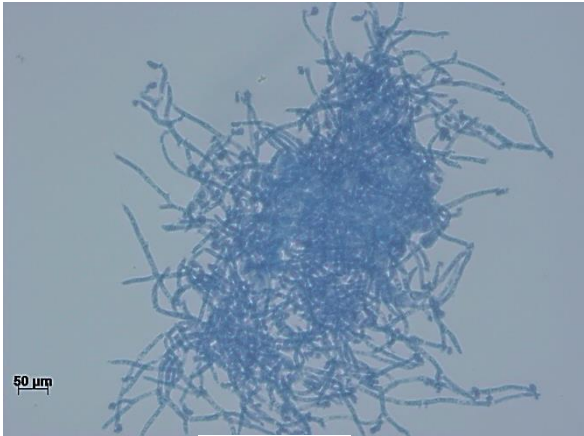


Lactato

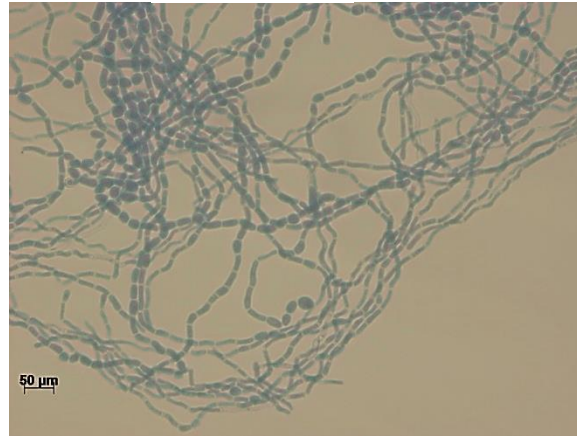


N-acetilglicosamina

T. ovoides



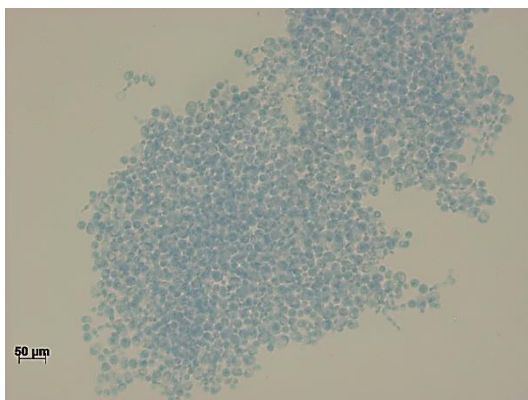
Glucose



Lactato



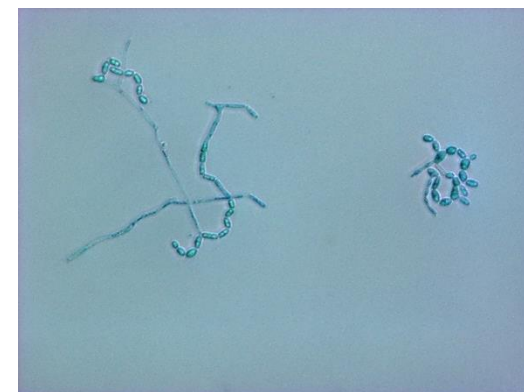
N-acetilglicosamina

C.arboriformis

Glucose



Lactato



N-acetilglicosamina

APÊNDICE C – Frequência de cada tipo de colônia de isolados da Família

Trichosporonaceae.

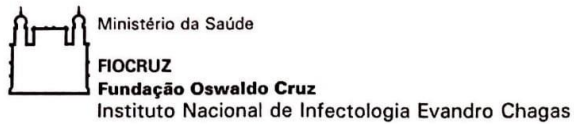
	Fenótipo 1	Fenótipo 2	Fenótipo 3	Fenótipo 4
T2- <i>T. asahii</i>	61,61%	-	38,38%	-
T5- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T6- <i>T. asahii</i>	57,97%	4,43%	23,22%	13,65%
T7- <i>T. asahii</i>	66,40%	-	-	33,59%
T9- <i>T. asahii</i>	84,18%	15,54%	-	0,26%
T11- <i>T. asahii</i>	29,48%	-	17,52%	52,99%
T12- <i>T. asahii</i>	-	97,89%	2,1%	-
T15- <i>T. asahii</i>	51,35%	-	26,12%	22,52%
T16- <i>T. asahii</i>	-	64,85%	-	4,02%
T20- <i>T. asahii</i>	-	-	3,84%	96,15%
T21- <i>T. asahii</i>	50,58%	49,41%	-	-
T22- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T24- <i>T. asahii</i>	-	17,15%	82,84%	-
T25- <i>T. asahii</i>	2,5%	-	-	97,43%
T26- <i>T. asahii</i>	-	100%	-	-
T28- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T29- <i>T. asahii</i>	-	100%	-	-
T31- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T33- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T35- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T36- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T37- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T38- <i>T. asahii</i>	61,89%	25,17%	-	12,93%
T42- <i>T. asahii</i>	-	100%	-	-
T44- <i>T. asahii</i>	-	-	100%	-
T45- <i>T. asahii</i>	50%	50%	-	-
T46- <i>T. asahii</i>	-	100%	-	-
T47- <i>T. asahii</i>	-	100%	-	-
T50- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T52- <i>T. asahii</i>	98,50%	1,49%	-	-
T53- <i>T. asahii</i>	-	100%	-	-
T54- <i>T. asahii</i>	93,84%	6,15%	-	-
T55- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T57- <i>T. asahii</i>	-	-	100%	-
T58- <i>T. asahii</i>	91,66%	4,76%	3,57%	-
T59- <i>T. asahii</i>	56,63%	-	43,36%	-
T60- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T61- <i>T. asahii</i>	84,18%	15,19%	0,61%	-
T63- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T64- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T68- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T69- <i>T. asahii</i>	50%	-	50%	-
T70- <i>T. asahii</i>	-	100%	-	-
T71- <i>T. asahii</i>	-	100%	-	-
T72- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T76- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T80- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T81- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T84- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-

T85- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T86- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T88- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T89- <i>T. asahii</i>	-	-	100%	-
T97- <i>T. asahii</i>	83,43%	-	16,56%	-
T98- <i>T. asahii</i>	86,29%	9,81%	3,89%	-
T99- <i>T. asahii</i>	37,07%	61,23%	1,68%	-
T101- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T103- <i>T. asahii</i>	75,11%	8,66%	-	16,22%
T104- <i>T. asahii</i>	30,13%	69,86%	-	-
T105- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T106- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T107- <i>T. asahii</i>	59,61%	17,03%	-	23,35%
T108- <i>T. asahii</i>	56,76%	43,23%	-	-
T109- <i>T. asahii</i>	100%	-	-	-
T121- <i>T. asahii</i>	81,29%	18,60%	-	-
T4- <i>T. japonicum</i>	0,389%	99,61%	-	-
T19- <i>T. japonicum</i>	100%	-	-	-
T13- <i>A. montevideense</i>	100%	-	-	-
T14- <i>A. montevideense</i>	100%	-	-	-
T111- <i>A. montevideense</i>	100%	-	-	-
T27- <i>T. inkin</i>	-	100%	-	-
T56- <i>T. inkin</i>	97,87%	2,12%	-	-
T66- <i>T. inkin</i>	-	100%	-	-
T120- <i>T. inkin</i>	-	100%	-	-
T62- <i>C. debeurmannianum</i>	100%	-	-	-
T65- <i>T. faecale</i>	100%	-	-	-
T67- <i>T. faecale</i>	100%	-	-	-
T112- <i>T. ovoides</i>	100%	-	-	-
T123- <i>C. arboriformis</i>	100%	-	-	-

Legenda: Fenótipo 1= branca e lisa; Fenótipo 2= branca e rugosa; Fenótipo 3= creme e lisa; Fenótipo 4= creme e rugosa. Fenótipos demonstrados na figura 16.

ANEXO

Anexo A - Carta de dispensa de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do INI



Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2019.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa do INI
Para: Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Prezado Dr. Rodrigo,

Em relação ao projeto **“Plasticidade metabólica, mudança fenotípica e moléculas associadas à parede celular de isolados clínicos do gênero *Trichosporon*”** encaminhado a este Comitê, informamos que, pela natureza do estudo e após análise desta Coordenação, evidenciou-se que não há necessidade de sua apreciação por um Comitê de Ética em Pesquisa; poderá ser submetido à publicação e divulgação dos resultados, com esta comunicação do CEP.

Atenciosamente,

Lea Camillo-Cours

Dr. Lea Ferreira Camillo-Cours
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa
Mat. SIAPE 00370620
INI/FIOCRUZ

VL