

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA BIOLÓGICAS

DANIEL FELIPE FREITAS DE JESUS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE
ADESINAS NA LEVEDURA EMERGENTE *TRICHOSPORON ASAHII***

Alfenas/MG

2018

DANIEL FELIPE FREITAS DE JESUS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE
ADESINAS NA LEVEDURA EMERGENTE *TRICHOSPORON ASAHII***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas nível mestrado.
Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.
Orientador: Prof^a. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan

Alfenas/MG

2018

Jesus, Daniel Felipe Freitas de.

Caracterização molecular e análise da expressão gênica de adesivas na levedura emergente *Trichosporon asahii* / Daniel Felipe Freitas de Jesus - Alfenas, 2018.

86 f. -

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Ana Carolina Barbosa Padovan
Bibliografia.

1. *Trichosporon*. 2. Adesinas. 3. Planctônico. I. Padovan, Ana Carolina Barbosa. II. Título.

CDD: 579



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG
CEP: 37.30-001



DANIEL FELIPE FREITAS DE JESUS

“Caracterização molecular e análise da expressão gênica de adesinas na levedura emergente *Trichosporon asahii*”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro

Aprovado em: 27 de fevereiro de 2018.

Profª. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: _____

Profª. Dra. Patricia Paiva Corsetti de Almeida

Instituição: UNIFENAS

Assinatura: _____

Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves

Instituição: UFRN

Assinatura: _____

Dedico esta obra aos meus pais José e Dirce e aos meus irmãos Flávio e Rodrigo. Pela dedicação, apoio, respeito e carinho durante toda a minha criação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar e proteger meu caminho e por ter me dado paz, tranquilidade, discernimento psicológico e por ter me dado coragem para seguir em frente ao longo dessa minha jornada.

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por me oferecer a oportunidade de crescimento acadêmico e pessoal.

À minha orientadora Dra. Ana Carolina B. Padovan, pelos ensinamentos, por ter confiado essa pesquisa a minha pessoa, pela contribuição para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Nelson José Freitas da Silveira, pelos ensinamentos, conselhos e inestimável colaboração durante a realização desta pesquisa.

Ao professor Dr. Leonardo Augusto de Almeida, pelos ensinamentos, conselhos, convivência e pela inestimável colaboração durante a realização desta pesquisa.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos ensinamentos e convivência ao longo dessa minha jornada.

Aos meus pais José e Dirce, por serem os meus maiores exemplos de vida e sucesso, pela força, dedicação, amor, carinho, e por serem a minha inesgotável fonte de inspiração todos os dias para continuar persistindo em meus sonhos.

Aos meus irmãos Flávio e Rodrigo pelo incondicional apoio ao longo dessa minha jornada, ensinamentos ao longo da minha vida, e por serem exemplos de profissionais e pessoas.

À família que a cidade de Alfenas me deu. Letícia Ferraz, Marcelo Garcia, Eduardo Alves, Alexandre Lima, Daniela Braga e Frederico Baeta, pelo companheirismo, conversas, amizade e aprendizado.

Aos meus colegas de Pós-Graduação e laboratório, pelo aprendizado, pesquisas, debates científicos e convivência ao longo dessa jornada.

*Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei(...)
(autor: Almir Sater)*

RESUMO

O gênero *Trichosporon* está classificado no filo Basidiomycota, é composto por 12 espécies, sendo *Trichosporon asahii*, a mais relevante clinicamente, causando infecções invasivas com mortalidade de até 80%. Isso deve-se não só o estado imunológico do paciente, mas também, a falhas nos tratamentos e formação de biofilmes em materiais implantados (cateteres), sendo resistente aos antifúngicos. A formação de biofilme depende de adesinas, que medeiam diferentes interações célula-meio, constituindo importante fator de virulência, que em *Trichosporon* nunca foram caracterizadas. Deste modo, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar molecularmente genes codificadores de proteínas com potencial função de adesão. Para isso, foram realizadas buscas (tBLASTn-NCBI) por genes hipotéticos de adesinas no genoma da linhagem de referência de *T. asahii* CBS2479, depositado em banco genômico, a partir de 23 adesinas conhecidas de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Além disso foi analisado o seu proteoma por meio dos programas de predições de adesinas *FungalRV* e *Faapred*. No servidor CBS prediction, realizou-se predições de peptídeo sinal, via de secreção, presença de hélices transmembrana, glicosilações, manosições e acetilações. Após essa seleção, realizou-se extração do DNA total dos quatro isolados de *T. asahii* (CBS2479, CBS7631, L2585 e L773) e PCR convencional, para verificação da existência das sequências. Em seguida prosseguiu-se com extração de RNA total dos quatro isolados cultivados de modo planctônico para análise de expressão gênica. Pelo tBLASTn revelou-se 1 proteína com 30% de identidade e 85% de similaridade com CFL1p de *C. neoformans*. Pelo *FungalRV* e *Faapred*, foram preditas 16 sequências em comuns como adesinas, sendo seccionados 17 pelos 3 programas de análise. Após aplicação de critérios de inclusão como tamanho da proteína (≥ 300 aminoácidos), presença de regiões conservadas que indiquem função de adesão, presença de peptídeo sinal e ausência de hélices transmembrana, foram selecionados 4 genes para estudo. A primeira proteína, CFL1p-like, contém 325 aminoácidos e apresenta O-glicosilações em 4 resíduos de serina/reonina (ser/thr), sem predição para N-glicosilações, com presença de sítios de ligações de manoses em 14 resíduos de triptofano (trp) e ausência de predição para de N-acetilação. A proteína Beta-like contém 1383 aminoácidos com 463 possíveis resíduos passíveis de O-glicosilações e 21 sítios preditos para N-glicosilações, não apresentando sítios de C-manosição e N-acetilação. Já a terceira foi chamada de Restina-like e contém 507 aminoácidos com 101 resíduos passíveis de receber O-glicosilação, sem sítios de N-glicosilação e N-acetilação, mas foi predita C-manosição em apenas um resíduo. A última proteína selecionada contém 406 aminoácidos, com 65 resíduos passíveis de O-glicosilação e 12 de N-glicosilação, sendo ausentes sítios de C-manosição e N-acetilação. Os quatro genes foram amplificados nos quatro isolados por meio da PCR convencional, e verificou-se por RT-PCR que todos os genes selecionados se apresentavam expressos nas linhagens. Os genes *MAR-like*, *RES-like* e *BETA-like* foram mais expressos na linhagem CBS2479 provenientes de micose de pele, demonstrando que o sítio de isolamento pode influenciar na expressão. Não foi possível relacionar a expressão gênica com capacidade de formação de biofilme dos isolados de hemocultura em crescimento planctônico. Contudo, as análises de expressão demonstram que o gene *CFL1-like* foi mais expresso nas de hemocultura CBS7631 e L773 que apresentavam morfologia predominante de artroconídeos, ao invés daquelas com morfologia filamentosa. Este trabalho ainda contribuiu para a anotação genômica das ORFs referentes aos genes, com modificação de hipotéticas para verificadas, ao identificar potenciais genes codificadores de adesinas no filo Basidiomycota utilizando como modelo, o patógeno emergente *T. asahii*.

Palavras-chaves: *Trichosporon*, adesinas, planctônico, *MAR-like*, *RES-like*, *CFL1-like* e *BETA-like*

ABSTRACT

The *Trichosporon* genus is classified within the Basidiomycota phylum and comprehends 12 species with *Trichosporon asahii* being the most clinically relevant species, causing invasive infections with mortality 80%. This is due not only to the patient's immune status, but also, to treatment failure and biofilm formation on implanted materials (catheters), which increase the resistance against antifungals. The biofilm formation depends on proteins expressed in the cell surface, called adhesins, which mediate cell-environment interactions, knowingly as important virulence factors, which are totally uncharacterized in *Trichosporon* spp.. Thus, the present work aims to characterize putative genes encoding proteins with potential adhesion function. For this, we searched (tBLASTn-NCBI) for hypothetical adhesin genes in the reference genome of *T. asahii* CBS2479, deposited in a genomic in public databases, from 23 well-known adhesins of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. In addition, its complete proteome was analyzed through adhesin prediction programs (*FungalRV* and *Faapred*). From the CBS prediction server, signal peptide prediction, secretion pathway, presence of transmembrane helices, glycosylations, mannosylations and acetylations were performed. After this selection, total DNAs was extracted from four isolates of *T. asahii* (CBS2479, CBS7631, L2585 and L773) and conventional PCR, to verify the existence of the complete ORFs. Then, total RNA extraction from the four planktonically cultivated isolates was performed for expression analysis by RT-PCR. As results, by tBLASTn only 1 protein was found with 30% identity and 85% CFL1p similarity to *C. neoformans*. Through *FungalRV* and *Faapred*, 16 sequences were predicted in common as adhesins, being selected 17 by the 3 programs of analysis. After applying other inclusion criteria such as: protein size (≥ 300 amino acids), presence of conserved regions indicating adhesion function, presence of signal peptide and absence of transmembrane helices, 4 genes were selected for our study. All selected putative genes possess protein chain predicted with more than 300 amino acids, signal peptide, absence of transmembrane helices and are secreted by the classical secretory pathway. The first one was named CFL1p-like protein and contains 325 amino acids, exhibits O-glycosylations on 4 serine/threonine residues (ser/thr), with no prediction for N-glycosylations, with presence of 14 residues of trioptophan (Trp) predicted with mannosylation and no prediction for N-acetylation. Beta-like protein contains 1383 amino acids with 463 possible residues of O-glycosylations and 21 sites predicted for N-glycosylations, showing no C-mannosylation and N-acetylation sites. The third putative protein was called Restin-like and contains 507 amino acids with 101 residues likely to receive O-glycosylation, without N-glycosylation sites and N-acetylation, but presented only one residue with C-mannosylation. The last selected protein contains 406 amino acids, with 65 residues with predicted O-glycosylation and 12 with N-glycosylation, without sites of C-mannosylation and N-acetylation. The four genes were amplified in the four isolates by conventional PCR, and it was verified by RT-PCR that all selected genes were expressed in the four *T. asahii* strains. Three of the four genes, *MAR-like*, *RES-like* and *BETA-like* were more expressed in the CBS2479 strain from skin mycosis, demonstrating that the isolation site may influence their expression in planktonic growth. It was not possible to relate expression levels to the biofilm formation capacity of blood culture isolates during planktonic growth. However, expression analyzes demonstrate that the gene CFL1-like gene was more expressed in blood cultures CBS7631 and L773 which had predominant morphology of arthroconids, rather than those with filamentous morphology. This work also contributed to the genomic annotation of the four ORFs, changing their status from hypothetical to verified sequences, by identifying genes that may encode novel adhesins of the Basidiomycota phylum using as model, the emerging pathogen *T. asahii*.

Keywords: *Trichosporon*, adhesins, planktonik, *MAR-like*, *RES-like*, *CFL1-like* and *BETA-like*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição dos 185 casos de tricosporonose invasiva entre os anos de 1975 a 2014. Fonte: adaptado de Liao, et al, 2015..... 21
- Figura 2 - Esquema com demonstração da formação do biofilme na levedura *C. albicans*. Fonte: Adaptado de Vila & Rozental, 2016..... 25
- Figura 3 - Estrutura genérica e processamento pós traducional de adesinas fúngicas. Man: manose, GlcN: glicosamina, EtN-P: etalonamina fosfato e Glc: glicose. Fonte: Adaptado de Groot, et al, 2013..... 26
- Figura 4 - Localização das adesinas com presença e ausência da âncora de GPI. na superfície celular após as modificações pós-traducionais. Fonte: Verstrepen, et al, (2009)..... 27
- Figura 5 - Fluxograma do delineamento experimental..... 31
- Figura 6 - Diagrama de Venn dos resultados de busca por adesinas por diferentes metodologias. Em verde, 1 adesina encontrada na ferramenta tBLASTn; em azul, 22 adesinas preditas pelo programa *FungalRV*; e em amarelo, 1217 adesinas preditas pelo programa *FaaPred* 48
- Figura 7 - Representação dos motivos conservados na proteína Beta-likep de *T. asahii*. A caixa preta destaca a região conservada BLLF1 compartilhado com herpes vírus que indica uma possível função de adesão..... 50
- Figura 8 - : Representação dos motivos conservados na proteína Restina-likep de *T. asahii*. A caixas pretas destacam as regiões conservadas: a superfamília Von Willebrand factor type A (vWA) entre os aminoácidos 33 e 170, e a família das mucinas conservada entre os entre os aminoácidos 348 e 438, indicam uma possível função de adesão..... 51

- Figura 9 - Representação dos motivos conservados na proteína *Mar-like* de *T. asahii*. As caixas pretas destacam as regiões conservadas: a superfamília BLLF1 compartilhado com herpes vírus entre os aminoácidos 117 e 385, e a superfamília das endomucinas conservada entre os entre os aminoácidos 204 e 343, indicam uma possível função de adesão..... 51
- Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR, genes: *Mar-like* (A), *Res-like* (B), *CFL1-like* (C) e os 3 fragmentos da *Beta-like* (D) amplificados a partir do DNA das linhagens de *T. asahii* CBS2479, CBS7631, L2585 e L773..... 53
- Figura 11 - Predições das características da proteína *CFL1-like* de *T. asahii* CBS2479: Em amarelo os aminoácidos que recebem *O*-glicosilação e em vermelho aminoácidos manosilados..... 54
- Figura 12 - Predições das características da proteína *Mar-like* *T. asahii* CBS2479: Em amarelo os aminoácidos que recebem *O*-glicosilação, as caixas destacam as asparaginas (N) passíveis de *N*-glicosilação..... 55
- Figura 13 - Predições das características da proteína *Beta-like* *T. asahii* CBS2479: Em amarelo os aminoácidos que recebem *O*-glicosilação, as caixas destacam as asparaginas (N) passíveis de *N*-glicosilação..... 55
- Figura 14 - Predições das características da proteína *Restina-like* *T. asahii* CBS2479: Em amarelo os aminoácidos que recebem *O*-glicosilação e em vermelho, aminoácidos manosilados..... 56
- Figura 15 - Observação das morfologias das quatro linhagens de *T. asahii* em microscópio óptico no aumento de 400 vezes na câmara de Neubauer, após o cultivo planctônico em meio cultura RPMI-1640. Os isolados *T. asahii* CBS2479 e L2585 apresentaram crescimento predominante na forma de hifas, enquanto os isolados *T. asahii* CBS7631 e L773, apresentaram crescimento predominante de artroconídeos..... 57

- Figura 16 - (A): Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do RNA extraído dos isolados de *T. asahii* CBS2479, CBS7631, L2585 e L773. (B): Eletroforese em gel de agarose a 1% após PCR convencional utilizando RNA tratado com DNase das quatro linhagens de *T. asahii*. O DNA genômico da linhagem CBS2479 foi utilizado como controle positivo..... 59
- Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da RT-PCR dos genes: β -*ACTINA*, *MAR-like*, *RES-like* (A), *BETA-like* (B) e *CFLI-like* (C). Dos quatro isolados de *T. asahii* CBS2479, CBS7631, L2585 e L773..... 60
- Figura 18 - Expressão dos genes *MAR-like* (A), *RESTINA-like* (B), *BETA-like* (C) e *CFLI-like* (D) e comparação da expressão gênica em relação ao sítio de isolamento entre a linhagem de *T. asahii* proveniente de micose superficial (CBS2479) em relação as provenientes de hemocultura (CBS7631, L773 e L2585)..... 62
- Figura 19 - Expressão dos genes *MAR-like* (A), *RESTINA-like* (B), *BETA-like* (C) e *CFLI-like* (D) e comparação da expressão gênica em relação ao sítio de isolamento entre a linhagem de *T. asahii* proveniente de micose superficial (CBS2479) em relação as provenientes de hemocultura (CBS7631, L773 e L2585)..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de adesinas conhecidas utilizadas para realização das buscas via tBLASTn-NCBI contra o genoma depositado de <i>T. asahii</i>	33
Tabela 2 - Características dos <i>Primers</i> desenhados para amplificação dos genes hipotéticos.....	38
Tabela 3 - <i>Primers</i> desenhados para análise da expressão gênica.....	40
Tabela 4 - Resultado da comparação realizada por meio do servidor tBLASTn-NCBI utilizando adesinas conhecidas de <i>C. albicans</i> e <i>C. neoformans</i> contra o genoma depositado de <i>T. asahii</i> CBS 2479.....	46
Tabela 5 - Adesinas selecionadas por meio do emprego das ferramentas de busca (tBLASTn-NCBI) e predição (<i>FungalRV</i> e <i>Faapred</i>), e presença ou ausência de peptídeo sinal.....	49
Tabela 6 - Adesinas putativas de <i>T. asahii</i> obtidas após aplicação dos critérios de seleção propostos.....	50
Tabela 7 - Quantificações e relação de pureza do DNA após extração com <i>glass beads</i>	52
Tabela 8 - Quantificações e relação de pureza do RNA após extração com <i>glass beads</i>	58

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- qPCR/RT-PCR* - Reação em cadeia da polimerase quantitativa/Reação em cadeia da polimerase em tempo real
- AIDS - Síndrome da imunodeficiência humana
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana
- AMB - Anfotericina B
- FLC - Fluconazol
- ITC - Itraconazol
- VRZ - Voriconazol
- CAS - Caspofungina
- MIC - Concentração mínima inibitória
- GXM - Glucoronoxilomanana
- N-TERMINAL* - Amino terminal
- C-TERMINAL* - Carboxi terminal
- GPI - Glicosilfosfatidilinositol
- RE - Retículo endoplasmático
- ALS* - *Agglutinin-like sequence*
- HWP* - *Hyphal cell wall protein*
- IFF/HYR* - *IPF Family F/Hyphally upregulated protein*
- CFL1* - Cell flocculin 1
- PCR - Reação em cadeia da polimerase
- CBS - *Centraalbureau voor Schimmelcultures*
- NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
- Flo* - Flocculin
- Thr* - Treonina
- Ser* - Serina
- Asp* - Asparagina
- aa* - Aminoácido
- SRP - Partículas de reconhecimento de sinal
- YEPD* - Yeast extract peptone dextrose
- SDA* - Sabouraud Dextrose Agar

tBLASTn - *translated Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*

pb - Pares de base

ORF - Open Reading Frames

T_m - Temperatura de melting

F_w - Foward

R_v - Reverse

TBE - Tris-Ácido bórico-EDTA

CBS - *Center for Biological Sequence Analysis*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	IMPORTÂNCIA CLÍNICA DE <i>Trichosporon</i> spp.....	18
2.2	SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS.....	21
2.3	FATORES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA.....	22
2.4	ADESINAS.....	25
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
4.2	ISOLADOS UTILIZADOS.....	32
4.3	INVESTIGAÇÃO DE GENES HIPOTÉTICOS CODIFICADORES DE ADESINAS EM <i>T. asahii</i>	32
4.3.1	Busca utilizando sequências nucleotídicas por meio da ferramenta tBLASTn-NCBI	32
4.3.2	Busca de utilizando sequências de proteínas preditas a partir do proteoma de <i>T. asahii</i> em programa de predição <i>FungalRV</i> e <i>Faapred</i>	34
4.4	PREDIÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS PROTEICAS.....	34
4.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DAS ADESINAS.....	35
4.6	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DAS ADESINAS SELECIONADAS.....	36
4.6.1	Extração de DNA	36
4.6.2	Tratamento com RNase	37
4.6.3	Quantificação e análise da pureza do DNA	37
4.7	PADRONIZAÇÃO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO DOS PRIMERS E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES HIPOTÉTICOS CODIFICADORES DE ADESINAS.....	38
4.7.1	Síntese dos primers para genes hipotéticos	38
4.7.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	39
4.7.2.1	Gel de agarose para verificação da amplificação.....	39
4.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ADESINAS PUTATIVAS DE <i>T. asahii</i> EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS.....	40
4.8.1	Desenhos de primers	40
4.8.2	Preparo da cultura planctônica e extração do RNA total	41
4.8.2.1	Tratamento com DNase e quantificação de RNA total.....	42
4.8.2.2	Verificação da qualidade do RNA extraído e purificado com DNase.....	42
4.8.3	Síntese de cDNA	43
4.8.4	Análise da expressão gênica por REAL TIME-PCR (RT-PCR) e análise dos dados	43
5	RESULTADOS	45
5.1	RESULTADO DA BUSCA DE GENES HIPOTÉTICOS CODIFICADORES DE ADESINAS POR MEIO DO tBLASTn.....	45

5.2	RESULTADOS DE BUSCA DE GENES HIPOTÉTICOS CODIFICADORES DE ADESINAS POR MEIO DOS PROGRAMAS DE PREDIÇÕES <i>FUNGALRV</i> E <i>FAAPRED</i> E APLICAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE SELEÇÃO.....	47
5.3	AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS GENES CODIFICADORES DE ADESINAS DE <i>T. asahii</i> POR PCR-CONVENCIONAL.....	52
5.4	PREDIÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS PROTEICAS QUANTO AS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS.....	54
5.5	CONTROLES DA EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DOS QUATROS ISOLADOS DE <i>T. asahii</i>	56
5.6	EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ADESINAS EM CRESCIMENTO PLANCTÔNICO.....	59
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Trichosporon* compreende fungos leveduriformes do filo *Basidiomycota*, sendo caracterizado fenotipicamente por formarem blastoconídios, artroconídeos, hifas e pseudo-hifas, sendo, deste modo, considerado como fungos pleomórficos. O gênero passou por intensa reclassificação, sendo composto por 12 espécies, destas 9 são classificadas como de importância clínica (CHAGAS-NETO et al., 2008; COLOMBO et al., 2011; FIGUEIREDO, 2013; LIU et al., 2015).

Esses organismos são encontrados principalmente nas regiões tropicais e temperadas, onde habitam os mais variados nichos ecológicos, estando presentes em solos, coleções hídricas, madeira em decomposição, aves e mamíferos, nos hospedeiros humanos, sendo isolados do sistema gastrointestinal e respiratório, pele e pelos (BEDOY et al., 2014; BENSON et al., 1983; CAFARCHIA et al., 2008; GUETHI, 2009; MARINÉ et al., 2014; MOK et al., 1982; SILVA-SCHULZE et al., 2014; SUGITA et al., 2000; SUGITA et al., 2004; WALALLING et al., 1987; WHITMAN et al., 2014).

Nos hospedeiros humanos, principalmente nas últimas três décadas, as espécies do gênero *Trichosporon* de relevância clínica tem sido responsáveis por inúmeras causas de infecções superficiais, invasivas e por reações alérgicas, sendo que nas infecções invasivas, *Trichosporon asahii* é a espécie mais frequentemente isolada (COLOMBO et al., 2011; PFALLER et al., 2009; PFALLER et al., 2007).

A habilidade de *T. asahii* em invadir e se disseminar pelos tecidos do hospedeiro depende de mecanismos de virulência, como por exemplo, produção de enzimas líticas, mudança de fenótipo, formação de biofilme, e possivelmente, expressão de proteínas de adesão que estão localizadas na superfície da parede celular, permitindo as interações com o meio, seja ela célula-célula e/ou célula-hospedeiro, sendo a maturação do biofilme diretamente relacionada a presença destas proteínas, pois estas que medeiam a adesão do fungo ao substrato (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; COLOMBO et al., 2011). Diante disso, o presente estudo tem por objetivo, caracterizar molecularmente e funcionalmente genes codificadores de proteínas de superfície celular fúngica com potencial função de adesinas em células planctônicas de *T. asahii*

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão do presente estudo está baseada em definições, importância, suscetibilidade a antifúngicos e fatores associados a virulência do gênero *Trichosporon*.

2.1 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DE *Trichosporon* spp

O gênero *Trichosporon* pode causar infecções em indivíduos tanto hígidos, cujo sistema imune encontra-se em equilíbrio, quanto imunocomprometidos, estas enfermidades são classificadas de acordo com o sítio de isolamento e o tipo de manifestação clínica. Sendo subdivididas em superficiais, quando acometem pelos (*Piedra* branca), pele e unhas; de hipersensibilidade, como na pneumonia por hipersensibilidade; e invasivas, quando atingem a via hematogênica, trato gastrointestinal e urinário, meninges, entre outros (BENSON et al., 1983; HALLEN-ADANS et al., 2015; HESLOP et al., 2011; KHAN et al., 2014; MARINÉ et al., 2014; RIZZITELLI et al., 2016; RUBIC et al., 2015; SUGITA et al., 2004; VASCONCELLOS et al., 2013; WALLING et al., 1987).

A tricosporonose superficial ocorre independente do estado imunológico do hospedeiro, sendo predominantemente relatada nos indivíduos hígidos, ocorrendo comumente nas unhas (onicomicose), pele, pelos e cabelos (*Piedra* branca) das diferentes áreas do corpo. A manifestação da micose superficial de unha está associada a fatores secundários, como por exemplo, a presença de traumas nas unhas causados pelo uso de calçados apertados e não arejados, as frequentes exposições a água (mantém a umidade) e a produtos de limpeza, são fatores que contribuem avidamente para prevalência desta manifestação clínica (MAGALHÃES et al., 2016; KOKSAL et al., 2009; SOUZA et al., 2007).

Na década de 80, Kalamán e colaboradores demonstraram que a tricosporonose cutânea era mais prevalente entre os homens, enquanto a *Piedra* branca, era mais frequentemente encontrada em mulheres, associou ambos tipos de acometimentos com as questões culturais, higiênicas e de gênero (KALAMAN et al., 1988). Para a instalação do blastoconídeo na epiderme, requer uma série de habilidades do mesmo. Sendo necessário transpor o sistema de defesa inato, como por exemplo a barreira física, que constantemente apresenta renovação epitelial mediada pelos queratinócitos, fazendo que as células mais velhas e mais superficiais

se descole do tecido, assim prejudicando a instalação do fungo no local, produção de defensas que controlam o crescimento microbiano na epiderme e síntese de substâncias que alteram o pH epitelial, acarretam na inibição ou diminuição da atividade das enzimas produzidas pelos fungos. Desta forma, para a ocorrência desta infecção faz necessário a ocorrência de um trauma no tecido, corroborando para perda da integridade epitelial (CORDEIRO, 2015; KALAMAN et al., 1988; PERES et al., 2010).

Já a *Piedra* branca é caracterizada pela presença de nódulos irregulares de coloração branca em torno da haste dos pelos e cabelos, ocorrendo principalmente em crianças e adultos jovens, em especial, no sexo feminino com faixa etária entre 20 a 30 anos, fato que pode estar relacionado com o tamanho e a umidade do cabelo, uso de óleos capilares e até mesmo vestimentas, como o uso de véu e burca por mulheres para cobrir o rosto e cabelo, contribuindo para maior taxa desse tipo de micose superficial nesse gênero (BENSON et al., 1983; ROSHAN & PARVEEN, 2009; TAMBE et al., 2009; TENDOLKAR et al., 2014; VIJAY et al., 2017).

Outro tipo de infecção está relacionado com o acometimento do sistema respiratório via sensibilização do sistema imune, sendo uma enfermidade de ocorrência sazonal, frequentemente relatada durante o verão japonês, cuja estação é a mais quente e úmida do ano, fatores estes que favorecem o desenvolvimento e disseminação do fungo nos diferentes ambientes (ANDO et al., 1995; SUGITA et al., 2004).

O contato primário dos antígenos de *Trichosporon* sp. com o sistema respiratório acarreta no desenvolvimento de uma resposta imune do tipo celular (células T) e humoral (formação de imunocomplexos), com prevalência de títulos elevados para as imunoglobulinas A e G, neste caso, evoluindo para hipersensibilidade do tipo III ou IV, acarretando diretamente no desenvolvimento da pneumonia mediada por hipersensibilidade. Este processo inicia-se com a inalação dos artroconídios do fungo pelo hospedeiro, e as reiteradas exposições aos antígenos do patógeno, mantém o mecanismo de defesa do hospedeiro constantemente ativado, acarretando no desenvolvimento da hipersensibilidade que passa a exercer uma ação deletéria no tecido pulmonar, causando diversos danos nas células que o compõe (ANDO et al., 1995; COLOMBO et al., 2011; SUGITA et al., 2004).

Desde 1970, quando Watson e Kallichurum reportaram o primeiro caso na literatura médica de infecção invasiva causada por *Trichosporon* sp., o número de relatos e dados epidemiológicos tem aumentando significativamente ao longo dos anos. Liao e seus colaboradores (2015) analisaram 185 casos de tricosporonose invasiva reportados em quatro continentes entre 1975 a 2014, demonstrando que ao longo das quatro décadas estudadas, a taxa

de casos positivos relacionados a tricosporonose invasiva aumentou gradativamente, sendo que a última década (2005-2014) apresentou o maior número de casos (65) notificados dessa infecção fúngica (Figura 1) (LIAO et al., 2015; WATSON; KALIICHURUM, 1970).

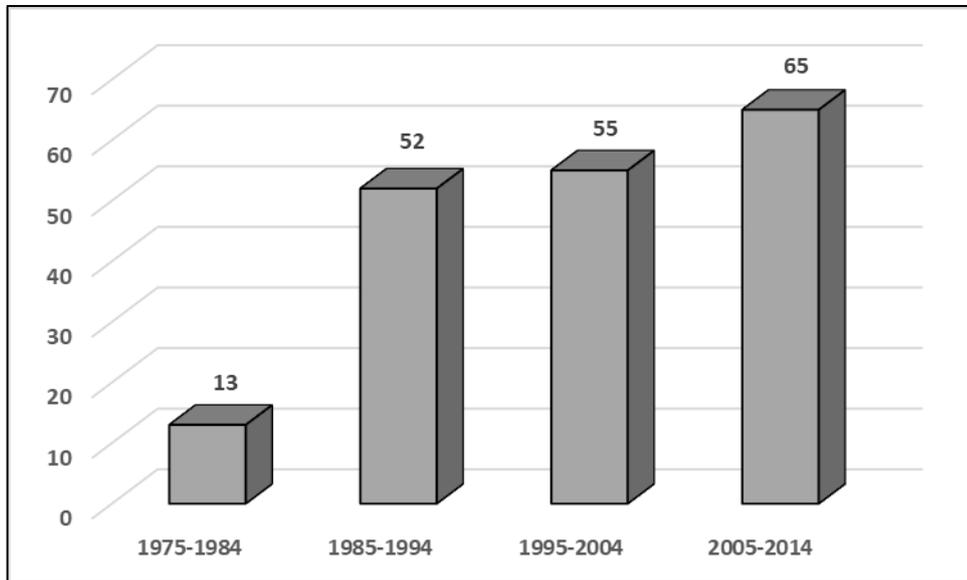


Figura 1: Distribuição dos 185 casos de tricosporonose invasiva entre os anos de 1975 a 2014.

Fonte: Adaptado de Liao, et al, 2015.

Segundo um estudo realizado por Pfaller e seus colaboradores em 2009, em que avaliaram 8.717 casos de infecções invasivas de diversas localidades do mundo, causadas por agentes leveduriformes não pertencentes ao gênero *Candida*, verificou-se que 10,6% tinham como agente etiológico alguma espécie de importância clínica do gênero *Trichosporon*, deste modo, sendo considerado o segundo grupo leveduriforme não-*Candida*, mais isolado destes indivíduos com infecções invasivas (PFALLER et al., 2009).

A tricosporonose invasiva pode ser localizada ou disseminada ocorrendo principalmente em indivíduos imunocomprometidos, sendo estes pacientes neutropênicos, transplantados, portadores de doenças hematológicas graves (leucemia), indivíduos infectados com HIV (AIDS), e além desses, aqueles que passaram por algum tipo procedimento médico invasivo (implante de próteses), ou que fazem uso prolongado de cateteres durante a hospitalização, compõem os principais grupos de risco para ocorrência da infecção pelo gênero *Trichosporon* (BHASKARAN et al., 2016; CHAITANYA et al., 2015; MAXFIELD et al., 2015; ODERO et al., 2014; REDDY et al., 2009; ROMAN et al., 2014; SIDAROUS et al., 1994; YANG et al., 2014; ZUO et al., 2015).

Para esses indivíduos vulneráveis infectados por *Trichosporon* spp. o prognóstico é pouco favorável, pois sabe-se que as espécies constituintes do grupo são formadoras de biofilmes, condição que lhes confere resistência às diferentes classes de antifúngicos que associado ao estado de imunocomprometimento, culmina com altos índices de mortalidade que podem abranger até 80% dos casos (COLOMBO et al., 2011; DI BONAVENTURA et al., 2006; ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014).

2.2 SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

A terapia medicamentosa para controle do avanço e eliminação de patógenos fúngicos nas infecções superficiais e invasivas conta com um restrito número de fármacos, como, anfotericina B (AMB) (polieno), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC), voriconazol (VRZ), (azóis) sendo estes os mais empregados para o gênero *Trichosporon*, e a caspofungina (CAS)(equinocandinas) o mais utilizado no controle de diversos fungos pertencentes a outros gêneros (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; FERA et al., 2009; HAZIROLAN et al., 2013; KUBIÇA et al., 2016; LIAO et al., 2014; PRADHAN et al., 2017; ZHANG et al., 2016).

Na literatura, o efeito desses fármacos e a suscetibilidade de *Trichosporon* spp. foram analisadas de forma *in vitro*, em culturas planctônicas, utilizando o protocolo de microdiluição em caldo preconizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (HAZIROLAN et al., 2013; ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; KUBIÇA et al., 2016; PRADHAN et al., 2017).

O polieno anfotericina B (AMB) é um fármaco natural, cujo mecanismo de ação é a ligação hidrofóbica ao ergosterol (tipo esterol) que está presente na membrana fúngica, sendo indispensável para biossíntese e manutenção da permeabilidade da membrana plasmática. Quando a AMB se liga ao ergosterol, corrobora para formação de poros e desestabilização da membrana plasmática, deste modo, alterando a permeabilidade, acarretando na perda de componentes citoplasmáticos, sendo muito utilizado para tratamento das infecções fúngicas invasivas. Sua ação e de outros antifúngicos (fluconazol, itraconazol e voriconazol) foi avaliada por Iturrieta-González e seus colaboradores em 2014 no gênero *Trichosporon*, demonstraram que o fármaco AMB apresentou alto índice de concentração mínima inibitória (MIC: $\geq 2\mu\text{g/mL}$), o que pode ser sugestivo de resistência. Em consonância com esse resultado, Kubiça

e seus colaboradores (2016) ao testarem 30 isolados clínicos de *T. asahii* frente a AMB, reportou que 90% deles foram resistentes ao fármaco AMB, mas sensíveis a fluconazol. Recentemente Pradhan et al (2017) demonstraram que isolados de *T. asahii* provenientes de hemocultura positiva, eram resistentes ao mesmo fármaco, reforçando que este fármaco não é uma escolha adequada para o tratamento de tricosporonose (HAZIROLAN et al., 2013; ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; KUBIÇA et al., 2016; PRADHAN et al., 2017).

Em outra via, mas ainda como alvo, o ergosterol, os triazóis, compostos sintéticos, cujo mecanismo principal de ação é a inibição da síntese do esterol presente na membrana fúngica. Esses fármacos ligam-se às enzimas do conjunto de citocromo P450 do fungo, desta forma, inibindo a desmetilação do lanosterol, composto precursor do ergosterol. Estes fármacos são amplamente empregados no tratamento micoses sistêmicas, com resultados promissores, e a ação dos fármacos fluconazol, itraconazol e voriconazol, têm sido explorados em testes de suscetibilidade *in vitro* para o gênero *Trichosporon*. Como podem ser observados nos estudos de Harizolan et al (2013) e Iturrieta-González et al (2014), ambos os autores reportam que fluconazol e itraconazol apresentam índices de MIC mais elevados quando comparados ao voriconazol, sendo este fármaco o mais apropriado para o tratamento de tricosporonoses invasivas (FOSTER et al., 2017; HAZIROLAN et al., 2013; ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; SIM et al., 2016).

A terceira classe de antifúngicos mais recentemente utilizada é a das equinocandinas, cujo principal representante é a caspofungina. Este composto é semi-sintético e tem como alvo a parede celular do fungo, pois inibe a ação da enzima β -1,3-glicana sintetase que está diretamente relacionada com a síntese de β -1,3-glicana, acarretando no desequilíbrio osmótico da célula. Este fármaco não tem se apresentado eficaz no controle do crescimento de *Trichosporon* spp, pois Liao et al (2014), ao testar a caspofungina contra isolados clínicos de *T. asahii*, revelaram elevados índices de MIC (8-32 μ g/mL), sendo sugestivo de resistência. Já Kubiça e seus colaboradores (2016), reportaram em seu estudo que 100% dos seus isolados clínicos de *T. asahii* testados (sensíveis a fluconazol) foram resistentes a ação da caspofungina. Deste modo, foi demonstrado que esse fármaco é inadequado para o tratamento de tricosporonoses (CHAGAS-NETO et al., 2009; KUBIÇA et al., 2016; LIAO et al., 2014).

2.3 FATORES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA

Os fungos possuem um amplo repertório de mecanismos que permite o sucesso da colonização e sobrevivência nos hospedeiros quando causando infecções. Este aparato que confere vantagens ao microrganismo é conhecido como fatores de virulência que envolvem mudança morfológica, produção e secreção de enzimas líticas, produção de polissacarídeo glucoronoxilomanana (GXM), formação de biofilmes e expressão de adesinas (COLOMBO et al., 2011; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Dentre os fatores associados a virulência, estão as mudanças micromorfológicas (levedura, hifas, pseudohifas, artroconídeos) e macromorfológicas (colônicas brancas e opacas) do fungo. Esses fenótipos estão associados com sua adaptação ao ambiente, evasão da resposta de defesa do hospedeiro e invasão dos seus tecidos, neste último evento, acarretando no dano e destruição das células que os compõem por meio da ação enzimática (ICHIKAWA et al., 2004; JAIN et al., 2008; KARASHIMA et al., 2002; MORALES et al., 2016; ZHU et al., 2017).

Em *Trichosporon* sp. esses mecanismos de virulência ainda não foram completamente esclarecidos, mas sabe-se que essas transições morfológicas são ativadas após sua passagem pelo hospedeiro. Este fenômeno foi observado por Karashima et al., (2002), ao passarem seus isolados ambientais por três vezes em hospedeiro murino, verificando que os isolados com colônias rugosas e com predominância de hifas, após a passagem, mudaram para colônias com aspecto de pó com predominância de blastoconídios (KARASHIMA et al., 2002). Além disso verificaram que após passagens no hospedeiro murino ocorreu aumento progressivo na concentração de GXM nesses isolados (KARASHIMA et al., 2002).

A transição morfológica foi estudada por Ichikawa et al (2016), revelando que diferentes isolados de *T. asahii* apresentavam várias texturas e colorações de colônia, bem como, alterações na proporção de blastoconídeos e hifas quando cultivados em diferentes meios de cultura. Ademais reportaram que todos os isolados clínicos de *T. asahii* apresentavam colônias com alta e baixa capacidade de adesão. Sendo assim, os autores especularam que as transições seriam relevantes para a virulência do microrganismo, pois fenótipos com alta capacidade de adesão favoreceriam a adesão e invasão do fungo no tecido do hospedeiro, e os fenótipos com baixa capacidade de adesão, permitiriam a disseminação do fungo por via hematogênica do hospedeiro (ICHIKAWA et al., 2016).

Portanto, esses fenótipos podem ocorrer durante a passagem pelo hospedeiro e também no ambiente, sendo considerado um importante mecanismo de virulência (ICHIKAWA et al.,

2016; ICHIKAWA et al., 2004; KARASHIMA et al., 2002; ZHANG et al., 2016; ZHU et al., 2017).

A síntese e secreção de enzimas (proteínases, fosfolipases, lipases, hemolisinas e Dnases) extracelulares permitem aos fungos a retirada de componentes nutricionais do ambiente, e, além disso, clivam proteínas e destroem as membranas das células hospedeiras, fato este que contribui para a patogenicidade de *Trichosporon* spp. (BENTUBO; GOMPERTZ, 2014; DAG; CERIKCIOGLU, 2006; GHANNOUM, 2000; MEVILLE et al., 2011; MONTOYA et al., 2015).

Uma outra estrutura de virulência no gênero *Trichosporon* é revelada como componente da parede celular, cuja superfície apresenta um polissacarídeo denominado de glucoronoxilomanana (GXM). Este antígeno de superfície de parede celular em *T. asahii* é similar àquele encontrado em cápsulas do gênero *Cryptococcus*, cuja função moduladora atenua a ação dos neutrófilos e monócitos, desta forma, protegendo da fagocitose e conferindo resistência ao patógeno diante da resposta imune do hospedeiro (COLOMBO et al., 2011; FONSECA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; URAI et al., 2016).

Outro importante mecanismo de resistência e proteção descrita em diversos fungos e no gênero *Trichosporon* é a capacidade de produzir biofilmes. Esta estrutura corresponde a forma mais comum de crescimento microbiano na natureza, sendo caracterizado como uma comunidade celular estruturada, aderida a uma superfície e envolvida por uma matriz extracelular polissacarídica que confere resistência as células leveduriformes frente aos antifúngicos e a fagocitose (Figura 2) (FONSECA et al., 2009; ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014).

A gênese do biofilme depende diretamente da capacidade de adesão das células aos diferentes tipos de substratos, essas interações estão associadas às proteínas superficiais denominadas adesinas, que são constituídas por algumas centenas de resíduos de aminoácidos. (COLOMBO et al., 2011; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017, GROOT et al., 2013).

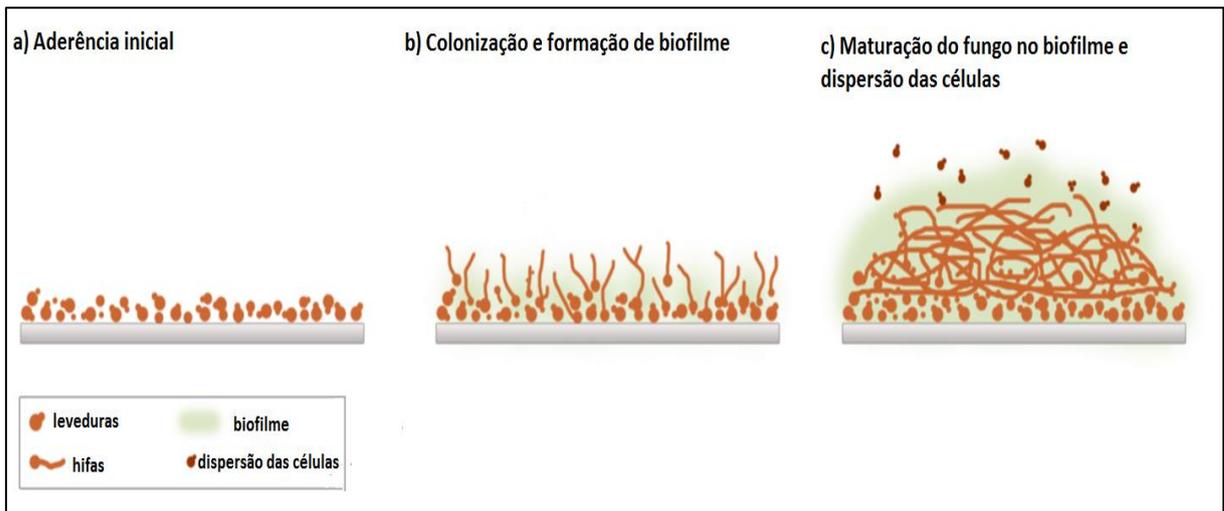


Figura 2: Esquema com demonstração da formação do biofilme na levedura *C. albicans*.

Fonte: Adaptado de Vila; Rozental, 2016.

2.4 ADESINAS

A interação dos microrganismos como protozoários, bactérias e fungos com o meio, depende inicialmente de mecanismos que permitam a colonização desses ambientes, e para isso, tais organismos apresentam uma diversidade de proteínas de superfície que favorecem essa interação com os diferentes nichos ecológicos (DRANGINIS et al., 2007; GARCIA et al., 2015; VERSTREPEN; FINK, 2009).

Os fungos já foram isolados de diversos nichos com os mais variados tipos de substratos (plásticos, vidros, tecidos de mamíferos), essa interação é possibilitada pelas proteínas superficiais denominadas adesinas, e naqueles fungos tidos como patogênicos configura-se como importante mecanismo de virulência, desta forma permitindo adesão destes as células de seus hospedeiros, além disso participam diretamente da formação do biofilme (BONY et al., 1997; DRANGINIS et al., 2007; GROOT et al., 2013; SHEPPARD, 2011; VERSTREPEN; FINK, 2009; VERSTREPEN et al., 2004).

As adesinas são geralmente grandes cadeias peptídicas, constituídas por diferentes regiões, sendo estas, a *N*-terminal, que contém peptídeo sinal, uma região *C*-terminal, a qual recebe um lipídio pré-formado chamada de glicosilfosfatidinositol que ancora a proteína na membrana citoplasmática (âncora de GPI), a terceira região de baixa complexidade, rica em aminoácidos do tipo serina e treonina, estes são passíveis de glicosilações, e uma quarta região

N-terminal, denominada de domínio efetor, o qual medeia as interações específicas célula-célula e célula-hospedeiro (Figura 3), (BONY et al., 1997; DRANGINIS et al., 2007; GROOT et al., 2013; SHEPPARD, 2011; VERSTREPEN; FINK, 2009; VERSTREPEN et al., 2004).

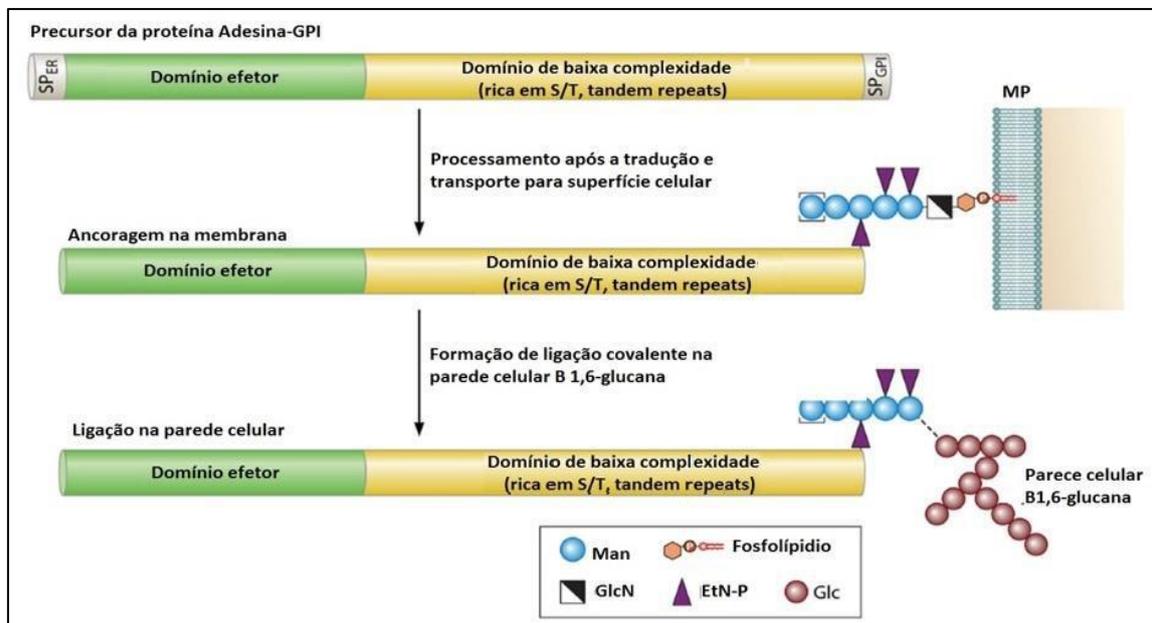


Figura 3: Estrutura genérica e processamento pós traducional de adesinas fúngicas. Man: manose, GlcN: glicosamina, EtN-P: etalonamina fosfato e Glc: glicose.

Fonte: Adaptado de Groot et al., 2013.

Em detalhes, após a tradução, antes de serem exportadas para superfície externa da parede celular, essas proteínas são enviadas para o retículo endoplasmático (RE), onde resíduos de aminoácidos (serinas e treoninas) podem receber glicosilações, manosilações e fosforilações (BONY et al., 1997; DRANGINIS et al., 2007; GROOT et al., 2013; VERSTREPEN; FINK, 2009; VERSTREPEN et al., 2004).

A exportação para o RE é mediada pela presença do peptídeo sinal, que é uma característica peculiar dos eucariotos, e ainda nessa organela, ocorrerá adição da âncora de GPI na região *C*-terminal da cadeia de aminoácidos, que vai prender a sequência proteica na membrana plasmática, e esta estrutura, pode ou não estar presente nas adesinas (Figura 3) (BONY et al., 1997; DRANGINIS et al., 2007; GROOT et al., 2013; VERSTREPEN; FINK, 2009; VERSTREPEN et al., 2004).

Na região *N*-terminal da cadeia, são encontrados os domínios com os quais ocorrem as interações específicas entre proteína-proteína e proteína-carboidratos dos diferentes substratos e um domínio de baixa complexidade, rica em serina e treonina que passará pelas modificações pós-traduccionais (Figura 3) (BONY et al., 1997; DRANGINIS et al., 2007; GROOT et al., 2013; VERSTREPEN; FINK, 2009; VERSTREPEN et al., 2004).

Após a ocorrência dessas modificações pós-traducionais no RE, as proteínas com função de adesão são enviadas pelo sistema de secreção clássica para a parede celular, deste modo, sendo expostas na superfície, onde é o seu destino final (Figura 4).

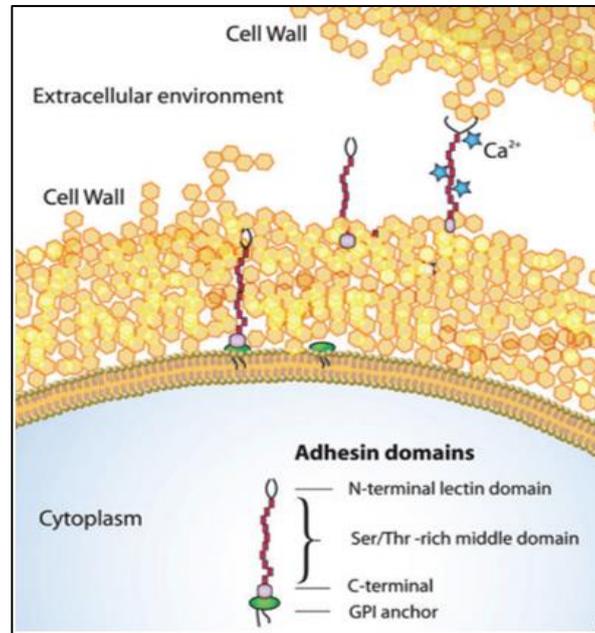


Figura 4: Localização das adesinas com presença e ausência da âncora de GPI, na superfície celular após as modificações pós-traducionais.

Fonte: Verstrepén,; Klis, (2006).

Nos fungos, essas adesinas já foram descritas em *Saccharomyces cerevisiae* em *Candida* sp, as quais tem sido amplamente estudadas, principalmente em *Candida albicans* (NOBILE et al., 2008; PADOVAN et al., 2009; ZHAO et al., 2004). No filo Basidiomycota apenas uma adesina foi descrita até o momento, e pertence à espécie *Cryptococcus neoformans* (WANG et al., 2012). Em *C. albicans* são conhecidas três classes de famílias codificadoras de adesinas, sendo *Agglutinin-Like Sequence (ALS)*, *Hyphal cell wall protein (HWP)* e a *Family F/Hyphally upregulated protein (IFF/HYR)* (GROOT et al., 2003; SHEPPARD et al., 2004; VERSTREPEN et al., 2004). A família *ALS* codifica oito glicoproteínas (ALS1p-ALS7p e ALS9p) responsáveis pela adesão do fungo e formação de biofilmes (AOKI et al., 2012; NOBILE et al., 2008; SHEPPARD et al., 2004; ZHAO et al., 2004).

A família *HWP* é constituída por cinco proteínas com funções diversificadas, diretamente relacionadas a transição levedura-hifa-levedura, sendo elas: a HWP1p e HWP2p: Estão envolvidas no processo de adesão em células epiteliais e em poliestireno, além de

contribuírem para formação de biofilme e hifas; a RBT1p: está envolvida na filamentação e repressão do gene *TUPI1*; a EAP1p/PGA47p: está envolvida na adesão em células epiteliais e em poliestireno, com importante papel na formação do biofilme e filamentação do fungo; e a YWP1p/PGA24p: está envolvida no processo de adesão e na formação do biofilme (GROOT et al., 2003; NOBILE et al., 2008; PADOVAN et al., 2009; SCHILD et al., 2011).

A família gênica *IFF/HYR* codifica 12 proteínas com cadeias que variam entre 500 a 1500 aminoácidos e compartilham similaridades no domínio efetor. Hyr1p medeia a resistência frente a ação de neutrófilos, pois a superexpressão dessa proteína na superfície da hifa pode impedir o contato direto dos neutrófilos com a mesma, tendo sua expressão dependente do gene *BCR1*, que é um importante fator de transcrição que regula a formação de biofilmes em *Candida* sp; Iff1/Rbr3p é uma proteína de parede celular que está envolvida no processo de filamentação e interação do fungo com o hospedeiro; Iff2/Hyr3p, Iff3p-Iff6p, Iff7/Hyr4p, Iff8p, Flo9/Iff9p e Iff10p: estão envolvidas na adesão em células epiteliais e em superfícies plásticas; Iff11p: proteína de parede celular que está envolvida na filamentação e com a interação do fungo com a célula hospedeira (BATES et al., 2007; BAILEY et al., 1996; BOISRAMÉ et al., 2011; Luo et al., 2011; Luo et al., 2010).

A importância da atividade desses genes codificadores de adesinas fica evidente quando são observados os efeitos deletérios em linhagens mutantes. Mutantes para os genes *ALS1* e *ALS3* em *C. albicans* tem sua atividade de aderência diminuída sobre células endoteliais (ZHAO et al., 2004). Nas cepas que tiveram o gene *ALS2* deletado observou-se diminuição da adesão e redução na destruição das células endoteliais, além disso ocorreu menor formação de biofilme sobre discos de elastômero que simulam a superfície de cateter (ZHAO et al., 2005). Para mutantes *C. albicans* nulos de Eap1p, apresentaram diminuição na adesão célula-célula e em cateter implantado em modelo murino, diminuindo consequentemente a formação de biofilme *in vitro*, fenômeno observado para adesão em células epiteliais (LI et al., 2007; LI; PALECEK, 2003).

Em *C. neoformans* muito pouco é conhecido sobre suas adesinas, sendo que o papel da adesina codificada pelo gene *CFL1* (*cell flocculin 1*), foi verificado por Wang e seus colaboradores em 2012, sendo este gene expresso somente na fase de hifa do fungo, além disso foi observado que o mesmo era responsável por regular a morfogênese, aglutinação célula-célula e formação de biofilme de *Cryptococcus* sp., e a linhagem mutante, ou seja, que teve o gene deletado, apresentou formação prejudicada de hifas (WANG et al., 2012).

No gênero *Trichosporon* não são reportados na literatura genes codificadores de adesinas, mesmo com os recentes avanços no sequenciamento no genoma total de cinco espécies do gênero (RIKEN, 2016; RIKEN, 2016; RIKEN, 2016; RIKEN, 2016; YANG et al., 2003). Entretanto sabe-se que *T. asahii* compartilha nichos de infecção e fenótipos de invasão tecidual, a exemplo da formação de hifas, bem como a formação de biofilme, com *C. albicans*, e compartilha ancestralidade genética com *C. neoformans* (LIU et al., 2015). Diante dessas características compartilhadas, formulou-se a hipótese de que *Trichosporon* spp. também tenham adesinas, as quais, até o momento, não foram descritas. Em função disso, o presente estudo tem como objetivo investigar nos genomas depositados de *T. asahii* a presença de genes que venham a codificar proteínas de superfície celular fúngica com potencial função de adesina em células planctônicas.

3 OBJETIVOS

Os objetivos fundamentados para o presente estudo estão demonstrados nos itens 3.1 e 3.2.

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente e funcionalmente genes codificadores de proteínas de superfície celular fúngica com potencial função de adesinas em células planctônicas *T. asahii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar por genômica comparativa genes hipotéticos de *T. asahii* potencialmente codificadores de adesinas, a partir de adesinas conhecidas de *C. albicans* e *C. neoformans*;
- b) Amplificar os genes das adesinas de *T. asahii* por PCR convencional para verificação da presença das *ORFs* completas em genoma de isolados clínicos além da cepa de referência *T. asahii* CBS2479;
- c) Analisar as sequências proteicas quanto as suas características putativas como a presença de peptídeo sinal, modificações pós-traducionais (glicosilações, manosilações e acetilações), via de secreção, predição de hélices transmembrana e presença de motivos putativos conservados que indiquem função de adesão;
- d) Induzir isolados de *T. asahii* provenientes de amostras clínicas invasivas a crescerem de forma planctônica para análise da expressão gênica diferencial das adesinas por qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para responder os objetivos propostos foram aplicadas diferentes metodologias que estão descritas nos próximos itens.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A presente pesquisa é composta pelas seguintes etapas apresentadas no fluxograma (Figura 5).

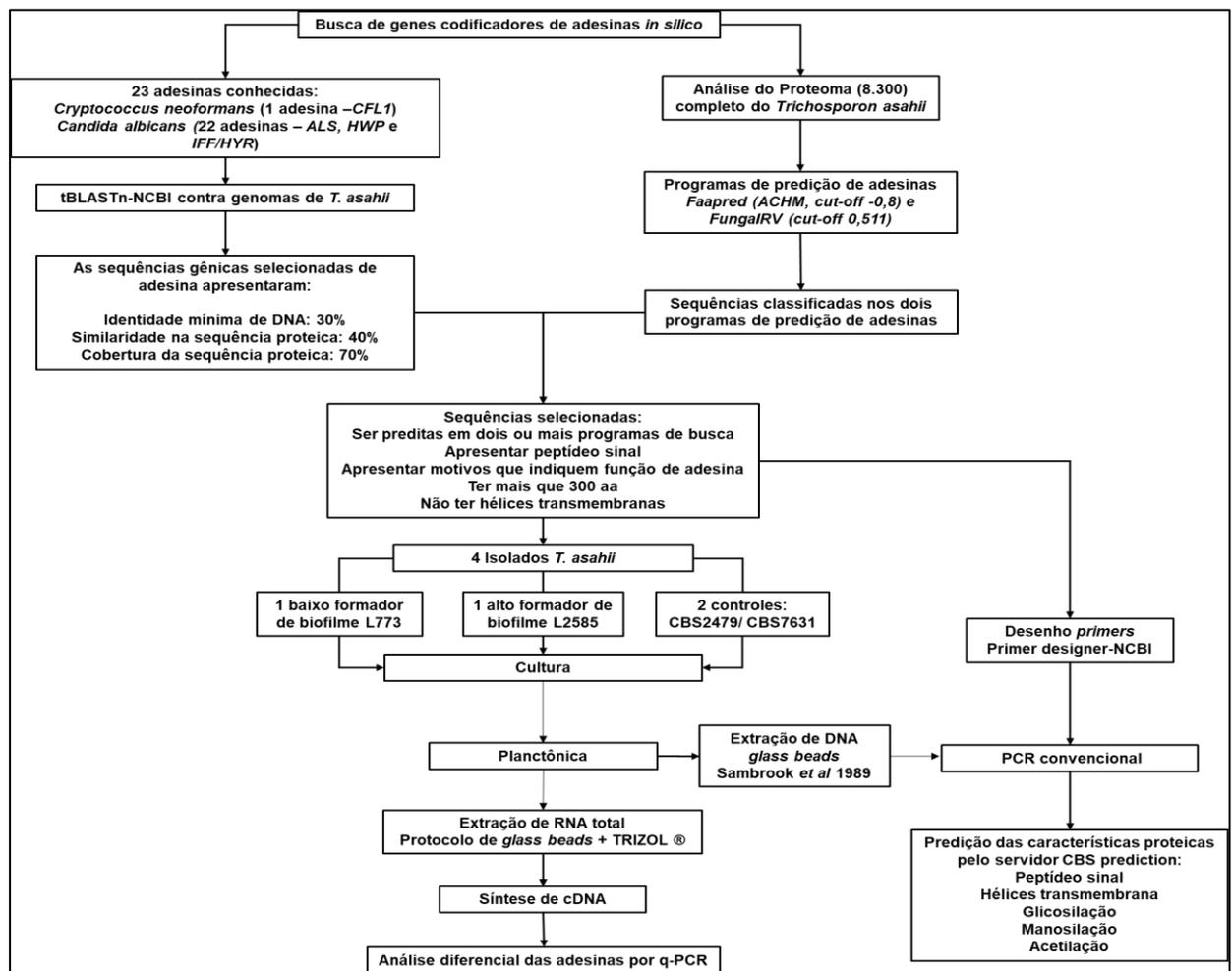


Figura 5: Fluxograma do delineamento experimental.

Fonte: Do Autor.

4.2 ISOLADOS UTILIZADOS

Foram utilizadas duas linhagens controle e dois isolados clínicos de *T. asahii* nos experimentos. A primeira cepa controle, *T. asahii* CBS2479, é proveniente de micose superficial de pele, cujo sítio apresentava lesão progressiva causada por psoríase; a segunda linhagem controle, *T. asahii* CBS7631, é proveniente de hemocultura; os dois isolados clínicos, respectivamente L773 e L2585, foram obtidos de amostras de sangue fornecidas via “Rede *Trichosporon* Brasil”, que é coordenada pelo colaborador do projeto, Professor Dr. Arnaldo Lopes Colombo, responsável pelo Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo (LEMI-UNIFESP).

Dados referentes aos isolados foram levantados. *Trichosporon asahii* CBS2479 tem seu genoma sequenciado e depositado em banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=trichosporon>). Iturrieta-González e seus colaboradores (2014), classificaram duas das linhagens como baixo formadoras de biofilme (CBS2479 e L773), um como médio e outro como alto formador de biofilme, respectivamente CBS7631 e L2585.

Todas as linhagens de *T. asahii* foram armazenadas em meio de cultura líquido Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) com 20% de glicerol em freezer a -80°C. As mesmas, antes de cada ensaio, foram reativadas e a viabilidade e pureza foram avaliadas respectivamente nos meios de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) e *ChromoAgar*® Candida (Difco).

4.3 INVESTIGAÇÃO DE GENES HIPOTÉTICOS CODIFICADORES DE ADESINAS EM *T. asahii*

A seguir serão descritas as ferramentas e padrões adotados para identificação das adesinas.

4.3.1 Busca utilizando sequências nucleotídicas por meio da ferramenta tBLASTn-NCBI

A partir de sequências codificadoras de adesinas conhecidas e as respectivas sequências proteicas das famílias gênicas de *CFL1* de *C. neoformans* e *ALS*, *HWP* e *IFF/HYR* de *C. albicans* (Tabela 1) foram realizadas buscas baseadas no tBLASTn (*translated Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) no genoma de referência de *T. asahii* CBS2479 depositado até então, para identificação de genes putativos codificadores de adesinas neste fungo.

Tabela 1 - Sequências de adesinas conhecidas utilizadas para realização das buscas via tBLASTn-NCBI contra os genomas depositados de *T. asahii*.

Genes de adesinas	Tamanho da proteína em aminoácidos	Seq. Id. NCBI	Espécie de origem	
Família ALS	<i>ALS1</i>	1260	AAC41649.2	<i>Candida albicans</i>
	<i>ALS2</i>	1756	XP_712085.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>ALS3</i>	1155	AAO72959.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>ALS4</i>	1593	EAK91163.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>ALS5</i>	1347	XP_718007.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>ALS6</i>	1366	AAO72081.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>ALS7</i>	2000	EAK97057.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>ALS9</i>	1833	AAP34370.1	<i>Candida albicans</i>
	Família HWP	<i>HWP1</i>	634	AAC96368.1
<i>HWP2</i>		908	XP_711622.1	<i>Candida albicans</i>
<i>RBT1</i>		714	XP_713003.1	<i>Candida albicans</i>
<i>EAP1/PGA47</i>		653	XP_714572.1	<i>Candida albicans</i>
<i>YWP1/PGA24</i>		553	XP_714462.1	<i>Candida albicans</i>
<i>HYR1</i>		919	EAL03412.1	<i>Candida albicans</i>
Família IFF/HYR	<i>RBR3/IFF1</i>	1562	Q5A5M7.2	<i>Candida albicans</i>
	<i>HYR3/IFF2</i>	1249	Q59XA7.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>IFF3</i>	941	Q5A029.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>IFF4</i>	1526	Q5AAL9.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>IFF5</i>	1308	Q5A1E0.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>IFF6</i>	1086	Q59XL0.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>IFF7</i>	714	Q59XB0.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>IFF9</i>	941	Q5A6U1.1	<i>Candida albicans</i>
	<i>CFL1</i>	309	AFR92926.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>

Fonte: Do autor

Foram selecionadas as sequências gênicas que apresentavam identidade mínima de 30% entre sequências de DNA, e sequência proteica predita com mínimo de 40% de similaridade e 70% de cobertura, sendo as porcentagens determinadas a partir da comparação das sequências de *T. asahii* com a sequência modelo da adesina CFL1p de *C. neoformans* descrita por Wang et al (2012).

4.3.2 Buscas utilizando sequências de proteínas preditas a partir do proteoma de *T. asahii* em programa de predição *FungalRV* e *Faapred*

O proteoma completo de *T. asahii* foi analisado por meio de dois programas de predições de adesinas, sendo *Fungal adhesins and adhesins-like proteins prediction (Faapred* <http://bioinfo.icgeb.res.in/faap/svmtool1.php>) e o *Adhesins prediction and immunoinformatics (FungalRV* <http://fungalrv.igib.res.in/>). Para determinar a positividade nas buscas por adesinas nestes programas foram utilizados pontos de corte pré-definidos pelos autores proponentes, empregando o ponto de corte de -0,8 no modelo de classificação ACHM, o algoritmo *Faapred*, apresentou melhor performance de classificação (sensibilidade e especificidade) do conjunto adesinas teste (biblioteca de 75 adesinas pertencentes a fungos ambientais e patogênicos), que foram utilizadas durante o processo de validação do programa (RAMANA; GUPTA, 2010). Já o algoritmo *FungalRV* foi validado com melhor performance de classificação (sensibilidade e especificidade) no ponto de corte 0,511, cujo conjunto de dados para validação do mesmo, era composto por 307 adesinas e adesinas-like de fungos exclusivamente patogênicos (CHAUDURI et al., 2011).

4.4 PREDIÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS PROTEICAS

A partir das sequências primárias de DNA das adesinas montadas, foram preditas as características das adesinas, com auxílio do programa *Center for Biological Sequence Analysis (CBS)* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>). Foram verificadas características como; (i) presença

de peptídeo sinal (SignalP 4.1), pois esta característica sinaliza que a proteína recém-sintetizada no ribossomo deve seguir para o retículo endoplasmático para passar por modificações pós-traducionais; (ii) ausência de regiões de hélices transmembrana (TMHMM server 2.0), predizendo que a proteína estaria inserida na membrana plasmática, deste modo não sendo exposta na totalidade na superfície celular; (iii) via de secreção (SecretomeP 2.0) determinada pela presença de peptídeo sinal, indicando o trajeto da proteína desde o retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas de transporte até a superfície celular; (iv) modificações pós-traducionais como acetilação (NetAcet 1.0), manosilação (NetCGlyc 1.0) e glicosilações (NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 4.0), sendo importantes sítios que medeiam a interação das proteínas com os carboidratos que compõem a parede celular e também as interações específicas no reconhecimento célula-célula e célula-hospedeiro.

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DAS ADESINAS

Para selecionar as sequências proteicas que foram classificadas como possíveis adesinas por meio das três ferramentas de busca tBLASTn, *Faapred* e *FungalRV*, foram propostos cinco critérios para inclusão das mesmas para o estudo, sendo que estes atributos de seleção foram baseados em particularidades de adesinas:

- a) A sequência deveria ser predita como possível adesina em duas das três ferramentas de pesquisa tBLASTn, *Faapred* e *FungalRV*;
- b) Presença do peptídeo sinal que sinaliza que a sequência será transportada para o retículo endoplasmático, onde passará por modificações pós-traducionais antes de ser exportado para o exterior da célula;
- c) Presença de motivos putativos conservados que indiquem função de adesão;
- d) Ter sequência proteica composta por 300 ou mais aminoácidos, proteínas que apresentem cadeia curta de aminoácidos estão sujeitas a pouca exposição na superfície celular, deste modo não ultrapassando a parede fúngica;
- e) Ausência de hélices transmembrana, caracterizando ausência de motivos inseridos na membrana plasmática.

4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTIDEOS DAS ADESINAS SELECIONADAS

Nos itens de 4.6.1 até 4.6.3 estão descritas as metodologias aplicadas para responder o objetivo B.

4.6.1 Extração de DNA

Todos os quatro isolados de *T. asahii* foram cultivados como culturas planctônicas em meio líquido YEPD (Para 1 litro: 10g extrato de levedura (Sigma), 20g bacto peptone (Difco) e 20g de dextrose (Sigma), incubados por 16 horas, 35°C, a 180 rpm (Incubadora Shaker Marconi-MA-420), tendo os DNAs totais extraídos em conformação com o protocolo de extração com *glass beads* de Sambrook et al (1989).

Após os isolados de *T. asahii* serem cultivados em Erlenmeyers com 5ml de meio líquido YEPD, frações de 1,5 mL da cultura foram transferidas para tubos do tipo *eppendorf* e centrifugados em centrífuga (*Eppendorf centrifuge 5403*) a 20160 g por 3 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* restante foi lavado com 1 mL de água destilada e novamente centrifugado a 20160 g por 2 min a 4°C, sendo esse procedimento repetido mais uma vez. As células foram então ressuspensas em 1 mL de solução de tampão de extração de DNA (para 1L de tampão: 100 mL de Tris-HCL [2M] e pH8, 500 mL NaCl [0,25M], 50 mL EDTA [0,5M], 50 mL SDS 10% e completar com água milli-Q estéril). A esta suspensão foi adicionada o mesmo volume de *glass beads* (tamanho:425-600µm - Sigma), e foram acoplados a agitador mecânico tipo vórtex (Biomixer), utilizando máxima velocidade por 10 min., para ocorrer o rompimento da parede celular e membranas.

Após este período, a fase líquida foi transferida para um novo tubo de 2 mL do tipo *eppendorf*, onde foi adicionado o mesmo volume de solução fenol:clorofórmio (1:1) pH 8,0 (USB-corporation) e novamente a amostra foi acoplado no vórtex e agitado por 10 min.

Após esse período, o material foi centrifugado a 20160 g por 20 min a 4° C. A fase aquosa contendo o DNA genômico foi recuperado e transferido para um novo tubo de 1,5 mL

do tipo *ependorf* e adicionado 0,6 volumes de isopropanol, agitado manualmente por inversão, e acondicionado em freezer -20°C para precipitar o DNA *overnight*.

No dia seguinte a amostra foi centrifugada a 20160 g por 20 min, a 4°C , e em seguida, o sobrenadante foi descartado e o DNA genômico foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado para retirada dos resíduos e novamente centrifugado com as mesmas condições acima descrita, sendo o sobrenadante descartado e o tubo seco a temperatura ambiente. Após secagem, o DNA foi ressuspensão em 30 μL de água milli-Q estéril e colocado em banho maria a 37°C por 10 min.

4.6.2 Tratamento com RNase

O DNA foi tratado com a enzima RNase A (Invitrogen), completando-se o volume para 100 μL totais com água Milli-Q estéril, 1 μL de TRIS-HCl 1M pH 7.4 e adicionando-se 0,5 μL de RNase A a 20mg/mL, sendo posteriormente incubado a 37°C por 60 min.

4.6.3 Quantificação e análise da pureza do DNA

A quantificação foi realizada em NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher), utilizando-se uma alíquota de 2 μL para análise. Após isso, a concentração em ng/ μL , as relações 260nm/280nm (relação DNA/proteína), 260nm/230nm (relação DNA/sal ou solventes) e a curva do gráfico foram empregados como parâmetros para avaliação da qualidade e pureza das amostras de DNA.

Para uso, os DNAs foram diluídos para a concentração de 40 ng/ μL , em alíquotas de 50 a 100 μL , mantidos a -20°C até o momento do uso.

4.7 PADRONIZAÇÃO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO DOS PRIMERS E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES HIPOTÉTICOS CODIFICADORES DE ADESINAS

Do item 4.7.1 ao 4.7.2.1 estão descritas todas as metodologias relacionadas com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), aplicadas para responder o objetivo B.

4.7.1 Síntese dos *primers* para os genes hipotéticos

A partir da seleção dos genes hipotéticos codificadores de adesinas ou *Open Reading Frames (ORFs)* nos genomas de *T. asahii*, foram sintetizados *primers* específicos (Tabela 2) por meio da ferramenta *Primer Design* do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para amplificação das *ORFs* completas com cerca de 1500 pb. Para genes maiores, foram desenhados *primers* internos para a amplificação de diferentes fragmentos com regiões sobrepostas.

Tabela 2: Características dos *Primers* desenhados para amplificação dos genes hipotéticos.

Gene	Primers	Sequência	Start	Stop	Tm do par	Tamanho esperado do fragmento (pb)
BETA-like	BetaFw1	5'CGGCAAAGCAAACCTCGACAT3'	-21	-1	52	1581
	BetaRv1	5'GTCACCGTTGTCGGTAGGAG3'	1561	1581		
	BetaFw2	5'ACGACAACCTCTGCTCCTTCG3'	1466	1486	53	1310
	BetaRv2	5'GAGGGGACGACAGACGAATC3'	2795	2776		
RESTINA-like	BetaFw3	5'AGCGAGGATGGCATTAGCAC3'	2677	2697	52	1492
	BetaRv3	5'TGTCTGGTGGTTGATGGGTT3'	+106	+87		
MAR-like	ResFw	5'CCATTTGACTACTCCGGCA3'	-25	-5	52	1641
	ResRv	5'TCACCGTCTTGAAGCAAGCA3'	+92	+72		
MAR-like	MarFw	5'TCCACCCTCTTTGACCCTT3'	-25	-5	52	1308
	MarRv	5'CCGATAGCGGGATTGTGCTTAT3'	+41	+19		
CFL-like	CFLFw	5'ATCCCCTGTATTCTCCCCCT3'	-111	-90	50	1229
	CFLRv	5'AGGGGATGGCGAAGAGTGT3'	1229	1210		

Nota: Tm: temperatura de anelamento; Start: ponto de iniciação; Stop: ponto de parada.
Fonte: Do autor.

4.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) foi empregado o kit PCR Master Mix (2x) da Promega (*Taq*DNA polimerase 50units/mL, dNTPs [400U_m] e MgCl₂ [3M_m] em tampão pH 8,5), armazenado em freezer – 20°C. O Master Mix (2x) (Promega) era retirado do freezer alguns momentos antes da montagem das reações passando por uma breve homogeneização e microcentrifugação, sendo acondicionado em caixas térmicas com gelo para manter a temperatura. Dentro dos *eppendorfs* eram adicionados 7,5 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de Master Mix (2x) (Promega), 1,5 µL *primer Forward* e 1,5 µL de *primer Reverse*, ambos na concentração de 10 µM e 2 µL de amostra de DNA a 40 ng/µL.

Em seguida, os tubos de PCR foram levados para o termociclador (Amplitherm Thermal cyclers) para amplificação do gene de interesse, com as seguintes condições de ciclagens: 94°C por 10 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, temperatura específica do *primer* por 45 seg e 72°C por 2 min, e estágio final de 72°C por 10 min.

4.7.2.1. Gel de agarose para verificação da amplificação

A visualização e avaliação da qualidade do produto da PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para cada 1 g de agarose foi utilizado um volume de 100 mL do tampão TBE 1X, e a mistura foi aquecida até que toda agarose fosse totalmente dissolvida. Em seguida, foi adicionado 4 µL do intercalante do DNA (*Neotaq brilliant Green Plus*) na mistura.

Após solidificação do gel, foram adicionados nos poços um volume de 10 µL, sendo divididos em 5 µL do produto de PCR, 2 µL de Orange G (Sigma) mais 3 µL de água livre de nucleases. Foram adicionados 5 µL do marcador de peso molecular *ladder* 100 bp (Amresco).

A corrida foi realizada aplicando-se tensão de 80 Volts, corrente de 400 mA a 150 Watts de potência por 90 min para realização da eletroforese e as imagens capturada a partir de transiluminador.

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ADESINAS PUTATIVAS DE *T.asahii* EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS

Do item 4.8.1 ao 4.8.4 estão descritos às metodologias aplicadas para responder o objetivo D.

4.8.1 Desenho de *primers*

Para análise da expressão gênica, pares de *primers* foram desenhados próximo a extremidade 3' das sequências codificadoras e estão descritos na Tabela 3. Os *primers* foram desenhados para anelarem-se idealmente na temperatura de 60°C. O gene da actina foi utilizado como normalizador nas análises de expressão (Tabela 3).

Tabela 3: *Primers* desenhados para análise da expressão gênica

Adesina/controle	<i>Primers</i>	Sequência	Tamanho esperado do fragmento (pb)
<i>CFL-like</i>	Fw	5'CCA GAA GCA GGA CAA CAC CA3'	165
	Rv	5'ATC ATG CAA GCC TTG AGG TC3'	
<i>BETA-like</i>	Fw	5'CTC TGC CAC TGA CGG AGA GT3'	100
	Rv	5'AAT GAT GTC TCC CTC CTG GAT 3'	
<i>RESTINA-like</i>	Fw	5'CCC TTC TTC CTC CTC CAC TC3'	112
	Rv	5'AGA GGA AGG AGT GGG CTC AG3'	
<i>MAR-like</i>	Fw	5'AAC GGT GGA GAC AAC CAG AC3'	109
	Rv	5'CCT TGC ACT GGT TGT TGT TG3'	
<i>Actina</i>	Fw	5'CCTTCGTTCTTGGTCTTGA3'	140
	Rv	5'TCAATGCCGTTGTACATGGT3'	

Fonte: Do autor.

4.8.2 Preparo da cultura planctônica e extração do RNA total

Os quatro isolados de *T. asahii*, cepas de referência CBS2479 e CBS7631, e os isolados clínicos L2585 e L773 foram crescidos em 20 ml de RPMI-1640 com pH 7.0 (Sigma) em erlenmeyer por 16 horas, 37°C a 180 rpm em incubadora (Incubadora Shaker Marconi-MA-420). Lâminas com as culturas foram realizadas para observação da morfologia das células em microscópio óptico (Nikon E200), no aumento de 100 e 400 vezes.

A extração do RNA foi realizada utilizando lise mecânica por agitação com *glass beads* (tamanho:425-600µm - Sigma), em gelo. As culturas planctônicas foram transferidas para tubos do tipo falcon de 50 mL e centrifugados a 1645 g por 15 min a 4° C (*Eppendorf centrifuge* 5403). Em seguida, os *pellets* foram transferidos para um tubo falcon de 15 mL e lavados com água destilada gelada estéril, e em seguida, centrifugado nas mesmas condições acima descritas.

O sobrenadante foi então descartado, e a lavagem, repetida mais uma vez, para a remoção do meio de cultura residual. Às células, foi adicionado um mesmo volume de *glass beads* (tamanho:425-600µm - Sigma) em relação ao *pellet* formado, e foi adicionado o mesmo volume da solução tampão de lise (Para 1L de tampão: 100 mL de Tris-HCL [2M] e pH8, 500 mL NaCl [0,25M], 50 mL EDTA [0,5M], 50 mL SDS 10% e completa com água milli-Q estéril tratada com DEPC) em relação ao volume formado pelo *pellet* e *glass beads* (tamanho:425-600µm - Sigma). Em seguida os tubos foram acoplados em vortex (Biomixer) e agitados em velocidade máxima para ocorrer lise celular por 20 min, sendo realizados ciclos de 30 segundos no vórtex e 30 segundos no gelo para minimizar a degradação do RNA.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 1645 g por 5 min a 4 °C (*Eppendorf centrifuge* 5403), após esse processo, todo o líquido foi transferido para um novo tubo sem as *glass beads*, e foi adicionado um volume igual do reagente TRIZOL (Sigma), e novamente agitados em máxima velocidade por 20 min, sendo alternados 30 segundos no vortex (Biomixer) e 30 segundos incubados no gelo. Ao término, as extrações foram incubadas por 10 min no gelo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1645 g por 15 min a 4°C (*Eppendorf centrifuge* 5403), e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo do tipo *eppendorf*, onde foi adicionado 0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL da fase aquosa recuperada, sendo os tubos incubados no gelo por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 20160 g por 20 min a 4°C (*Eppendorf centrifuge* 5403).

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com etanol 75% gelado e novamente centrifugado na máxima velocidade por 5 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* seco por 5 min a temperatura ambiente em fluxo e congeladas a -80°C.

4.8.2.1 Tratamento com DNase e quantificação de RNA total

As extrações de RNA foram ressuspensas em 50 µL de água livre de RNase e em seguida foi realizado o tratamento com DNase RQ1 (PROMEGA), de acordo com protocolo preconizado pelo fabricante da enzima. Posteriormente ao tratamento, as amostras de RNAs foram quantificadas no equipamento NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer da Thermo Fisher, sendo utilizado uma alíquota de 2µL por amostra. Essas amostras foram tratadas para 10µL finais, para isso foi utilizado 1µg do material extraído (1-8µL) e adicionou-se 1µL de solução tampão 10x concentrado e mais 1µL da enzima DNase (1u/1µL) em seguida a solução com os 10µL finais, foi incubada por 30 min a 37°C em banho maria. Transcorrido esse período foi adicionado 1µL da solução de parada da enzima e novamente foi incubado por 10 min a 65°C em banho maria.

Subsequentemente os RNAs foram novamente quantificados no equipamento NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer da Thermo Fisher, e foi utilizado uma alíquota de 2µL da amostra tratada para análise, sendo calculadas a concentração em ng/µL, as relações 260nm/280nm, 260nm/280nm e a curva do gráfico para avaliação da qualidade e pureza das amostras de RNA. Os RNAs foram acondicionados novamente em freezer -80°C, até o momento do uso.

4.8.2.2 Verificação da qualidade do RNA extraído e purificado com DNase

Para se verificar a eficiência da extração de RNA foi preparado um gel de agarose a 0,8% e em cada poço foram aplicados 5µg das extrações e 1µL de Orange G (Sigma), sendo empregados para a eletroforese 70 volts por 90 min.

Após o tratamento da amostra extraída de RNA com a DNase RQ1, foi realizado uma PCR convencional desses RNAs utilizando os *primers* da actina (tm 60°C), para verificação de resíduos de DNA, como controle foi empregado o DNA genômico da linhagem *T. asahii* CBS2479 (40ng/μL). Para montagem da reação foram utilizados RNAs tratados a 100 ng/μL, *primers* na concentração de 10μM e Master Mix (2X) (Promega), como nas condições já descritas no item 4.7.2. Após isso, foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1% como descrito no item 4.7.2.1.

4.8.3 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, primeiramente as amostras foram normalizadas para 1μg. Em seguida foram preparadas duas misturas, uma contendo 1 μL de oligo(dT) (50μM), 1μL do mix de dNTPs (10mM cada) e volume suficiente de amostra de RNA para atingir 1μg, sendo um volume final desse mix de 13μL. Esse mix foi brevemente homogeneizado e centrifugado, em seguida seus componentes foram aquecidos por 5 min a 65°C, após isso foi incubado no gelo por pelo menos 1 min.

Durante esse período foi montado o segundo mix que contém a enzima transcriptase reversa, cujo kit utilizado foi o da Superscript IV RT (Invitrogen/Life Technologies). Sendo utilizado para montagem do mix 1μL da enzima transcriptase reversa (200U/μL), 1μL do estabilizador de enzima DTT (100mM) e 4μL da solução tampão SuperScript IV 5X concentrado. Em seguida, esse mix contendo DTT, enzima transcriptase reversa e solução tampão, foi brevemente homogeneizado e centrifugado.

O primeiro mix foi misturado ao segundo, sendo o tubo incubado por 10 min a 55°C, após esse período, incubou-se por 10 min a 80°C para a inativação da enzima. Após esta etapa o cDNA recém-sintetizado foi diluído 1:10 em água Milli-Q tratada com DPEC, para a realização da PCR em tempo real (RT-PCR).

4.8.4 Análise da expressão gênica por *REAL TIME-PCR* (RT-PCR) e análise dos dados

Para realizar a RT-PCR foram utilizados em cada reação, 3µL do cDNA diluído 1:10, 1µL de *primer Fw* e 1µL *primer Rv* (10mMolar) (tabela 3) e 5µL de SYBR® Geen (Sigma-Aldrich), para um volume final de 10µL. Foi empregado o gene da actina como controle positivo e normalizador, e como controle negativo, havia apenas o mix com os *primers*, ausente de cDNA. Todas as reações foram preparadas em placas ópticas de 48 poços sendo vedadas com selante para evitar evaporação e em seguida, as reações eram analisadas em Real-Time-PCR no equipamento StepOne (*Applied Biosystems*).

Neste equipamento foi utilizada a ciclagem padrão do reagente SYBR para 40 ciclos, disponibilizado no equipamento, com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95° C por 10 min, desnaturação a 95°C por 15 seg e anelamento dos *primers* e extensão da fita a 60°C por 1 min. A análise da curva de *melting* foi feita ao final de cada corrida como controle de qualidade da amplificação gênica.

Os dados produzidos durante a RT-PCR foram transferidos para a planilha no Excel (Pacote office Microsoft), onde foram analisados, para isso foram utilizados *cycle threshold* (*Ct*), ciclo onde a reação entra em fase exponencial e que permite a detecção de fluorescência capitado durante a reação de amplificação, ou seja, o número mínimo de ciclos para amplificação, deste modo, permite determinar o número de ciclos necessário para o início da amplificação da sequência gênica-alvo.

Para análise da expressão gênica através da RT-PCR foi empregado o método comparativo de $2e\text{-Delta-Delta Ct}$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Inicialmente, foi necessário calcular o Delta Ct (ΔCt) referente a cada gene alvo menos o gene controle, ou seja, cada um dos quatro genes (*BETA-like*, *RESTINA-like*, *MAR-like* e *CFL1-like*), menos o valor do gene normalizador ($\beta\text{-ACTINA}$).

Em seguida, calculou-se o Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), no qual o Delta Ct (ΔCt) de um gene de um isolado é subtraído do Delta Ct (ΔCt) do mesmo gene de outro isolado diferente a fim de se realizar comparações de expressão relativa. Foram realizadas comparações entre isolados de hemocultura (CBS7631, L773 e L2585), em relação ao isolado de psoríase CBS2479, e entre isolados de hemocultura médio e alto produtores de biofilme, respectivamente CBS7631 e L2585, em relação, ao baixo formador de biofilme, L773.

Obtido os valores do $\Delta\Delta Ct$, pode-se realizar a análise da expressão gênica por meio do método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Ao realizar as comparações da expressão gênica entre os dois grupos, foi realizada a montagem dos gráficos e a análise estatística no programa GraphPad Prism versão 7.04. Para análise estatística foram aplicados o teste *one-way* ANOVA e teste de Tukey.

5. RESULTADOS

Do item 5.1 ao 5.6 estão descritos os resultados obtidos no presente estudo, sendo que os mesmos respondem aos objetivos específicos (A, B, C e D), delineados na secção 3 (Objetivos), expostos na página 29.

5.1. RESULTADO DA BUSCA DE GENES HIPOTÉTICOS CODIFICADORES DE ADESINAS POR MEIO DO tBLASTn

Foram utilizadas 23 sequências de adesinas já descritas, sendo 22 pertencentes a *C. albicans* e uma descrita em *C. neoformans* (Tabela 1), e a partir dessas foram realizadas análises comparativas contra o genoma depositado de *T. asahii* CBS2479 (única com o genoma sequenciado).

Para isso foi empregado a ferramenta tBLASTn (*protein-translated nucleotide*), disponível no servidor do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Os resultados obtidos a partir desse mecanismo de busca estão apresentados na tabela 4 e descritos a seguir.

Tabela 4: Resultado da comparação realizada por meio do servidor tBLASTn-NCBI utilizando adesinas conhecidas de *C. albicans* e *C. neoformans* contra o genoma depositado de *T. asahii* CBS2479.

Adesinas	Seq. Id. no genoma de <i>T. asahii</i>	Identidade	Cobertura	Similaridade
<i>ALS1</i>	XM_01432748.1	29%	4%	46%
<i>ALS2</i>	-	0%	0%	0%
<i>ALS3</i>	-	0%	0%	0%
<i>ALS4</i>	-	0%	0%	0%
<i>ALS5</i>	-	0%	0%	0%
<i>ALS6</i>	-	0%	0%	0%
<i>ALS7</i>	-	0%	0%	0%
<i>ALS9</i>	-	0%	0%	0%
<i>HWP1</i>	-	0%	0%	0%
<i>HWP2</i>	-	0%	0%	0%
<i>RBT1</i>	XM_014328357.1	44%	3%	68%
<i>EAP1/PGA47</i>	XM_014326929.1	57%	3%	71%
<i>YWP1/PGA24</i>	-	0%	0%	0%
<i>HYR1</i>	XM_014327495.1	28%	2%	69%
<i>RBR3/IFF1</i>	XM_014325867.1	46%	1%	57%
<i>HYR3/IFF2</i>	-	0%	0%	0%
<i>IFF3</i>	XM_014321502.1	49%	3%	56%
<i>IFF4</i>	-	0%	0%	0%
<i>IFF5</i>	-	0%	0%	0%
<i>IFF6</i>	-	0%	0%	0%
<i>IFF8</i>	-	0%	0%	0%
<i>IFF9</i>	XM_014321502.1	49%	3%	56%
<i>CFL1*</i>	XM_014322862.1	30%	85%	43%

Nota: *A sequência em negrito destaca a adesina que teve correspondência no genoma de *T. asahii* CBS2479, cujo resultado estava em conformidade ao ponto de corte proposto.

Fonte: Do autor.

Das 23 sequências de adesinas utilizadas para realizar as análises comparativas contra o genoma de *T. asahii*, oito tiveram correspondências no genoma de *T. asahii*, sendo que sete destas sequências apresentavam baixos valores de cobertura (1 a 4%) e similaridade (29 a 57%). Ressalta-se que destas apenas a CFL1p de *C. neoformans* apresentou valores de cobertura (85%) e similaridade (43%) de acordo com o ponto de corte proposto. Desta forma, sete foram

descartadas, tendo em vista os valores de inclusão/exclusão, e apenas uma sequência selecionada para o estudo.

5.2 RESULTADOS DE BUSCA DE GENES HIPOTÉTICOS CODIFICADORES DE ADESINAS POR MEIO DOS PROGRAMAS DE PREDIÇÕES *FUNGALRV* E *FAAPRED* E APLICAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Em um segundo momento foram utilizados dois programas de predição de adesinas, sendo o *Fungal adhesins and adhesins-like proteins prediction (Faapred)* e o *Adhesins prediction and imunoinformatics (FungalRV)*, para identificação de novos candidatos proteicos, cuja classificação fosse de adesina.

Por meio das ferramentas de predições de adesinas, avaliou-se o proteoma completo da espécie *T. asahii*, composto por 8.300 proteínas preditas a partir dos genomas sequenciados. No programa *Faapred*, foram obtidas 1.217 proteínas com potencial de adesina, e nas predições do *FungalRV*, foram obtidas 22 sequências proteicas imputadas como adesinas. A figura 6 mostra um diagrama de conjunto do tipo união com o número de adesinas putativas detectadas em cada ferramenta de busca e aquelas que foram preditas em comuns pelos mesmos.

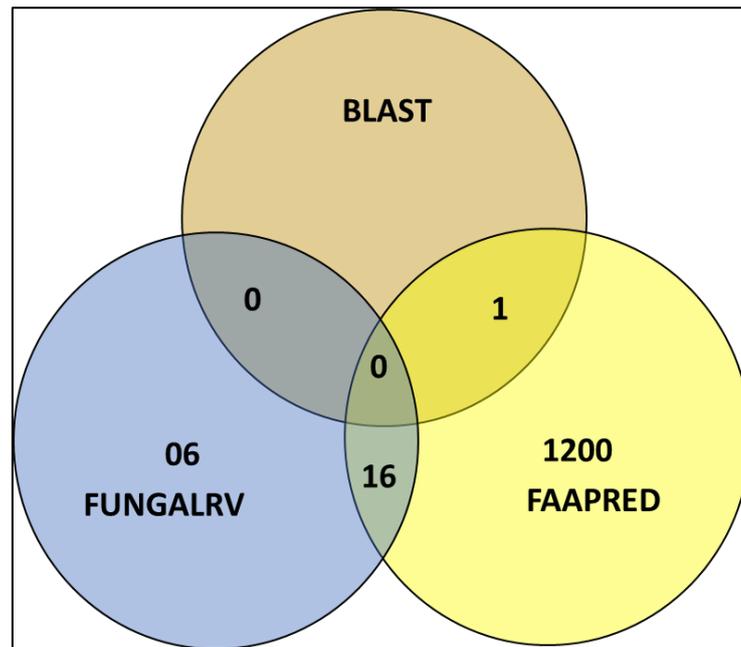


Figura 6: Diagrama de Venn dos resultados de busca por adesinas por diferentes metodologias. Em verde, 1 adesina encontrada na ferramenta tBLASTn; em azul, 22 adesinas preditas pelo programa FungalRV; e em amarelo, 1217 adesinas preditas pelo programa FAAPRED.

Fonte: Do autor.

Quando aplicado o primeiro critério de seleção das adesinas (a adesina selecionada deveria estar presente em pelo menos duas das três ferramentas), 17 adesinas putativas foram selecionadas. Estas adesinas foram submetidas às demais análises empregando as ferramentas presentes no servidor de predição *Center Biological Sequence Analysis* (CBS). Neste servidor foi realizado a predição para presença de peptídeo sinal, característica peculiar presente nas adesinas dos microrganismos eucariotos. Nesta análise se evidenciou que apenas nove sequências apresentavam presença de peptídeo sinal e oito com ausência do mesmo (tabela 5).

Tabela 5: Adesinas selecionadas por meio do emprego das ferramentas de busca (tBLASTn-NCBI) e predição (*FungalRV* e *Faapred*), e presença ou ausência de peptídeo sinal.

Identificação proteica no genoma de <i>T. asahii</i> CBS2479	Número de aminoácidos	Método de classificação	Peptídeo sinal
XP_014181007.1*	214	Faapred e FungalRV	Presente
XP_014181724.1*	1383	Faapred e FungalRV	Presente
XP_014178046.1*	227	Faapred e FungalRV	Presente
XP_014178019.1	470	Faapred e FungalRV	Ausente
XP_014179481.1	529	Faapred e FungalRV	Ausente
XP_014179033.1	231	Faapred e FungalRV	Ausente
XP_014176961.1	259	Faapred e FungalRV	Ausente
XP_014180477.1*	353	Faapred e FungalRV	Presente
XP_014176431.1*	507	Faapred e FungalRV	Presente
XP_014180756.1	147	Faapred e FungalRV	Ausente
XP_014176981.1	218	Faapred e FungalRV	Ausente
XP_014182511.1	669	Faapred e FungalRV	Ausente
XP_014183496.1*	406	Faapred e FungalRV	Presente
XP_014180934.1*	371	Faapred e FungalRV	Presente
XP_014178827.1*	441	Faapred e FungalRV	Presente
XP_014179969.1	152	Faapred e FungalRV	Ausente
XP_014178337*	325	tBlastn e Faapred	Presente

Nota: *O negrito destaca as adesinas putativas que foram selecionadas por serem preditas com peptídeo sinal.
Fonte: Do autor.

Estas nove adesinas putativas com peptídeo sinal foram submetidas a uma nova triagem, sendo aplicados as mesmas, os três critérios de seleção seguintes: predição da presença de regiões que poderiam revelar alguma função de adesina, via ferramenta BLASTp-NCBI, tamanho da sequência proteica composta por 300 ou mais aminoácidos e predições de ausência de hélices transmembrana. Por meio destes crivos, constatou-se que das nove proteínas de interesse, apenas três apresentaram motivos conservados que indicavam uma possível função de adesão, e todas possuíam em sua constituição mais de 300 aminoácidos, além disso as mesmas foram preditas com ausência de hélices transmembranas e são secretadas pela via clássica de secreção (Tabela 6).

Tabela 6: Adesinas putativas de *T. asahii* obtidas após aplicação dos critérios de seleção propostos.

Identificação proteica no genoma de <i>T. asahii</i> CBS2479	Número de aminoácidos	Presença de Motivos conservados conhecidos	Predição de hélices transmembranas	Via de secreção
XP_014181724.1	1383	Sim	Ausência	Clássica
XP_014176431.1	507	Sim	Ausência	Clássica
XP_014183496.1	406	Sim	Ausência	Clássica
XP_014178337	325	Não	Ausência	Clássica

Fonte: Do autor.

A proteína XP_014181724.1 foi denominada de Beta-*likep* e apresentou cinco regiões conservadas, sendo pertencentes a família do núcleo P87, a superfamília ICP4_C, a superfamília BLLF1, a superfamília DnaJ e uma pertencente à família da Dna-pol3-gamma3. Contudo apenas a região conservada pertencente a superfamília BLLF1, entre os aminoácidos 821 e 1208, é um motivo compartilhado com herpes vírus que indica uma possível função de adesão (figura 7). Além dessa região, a proteína apresenta folhas-beta pregueada.

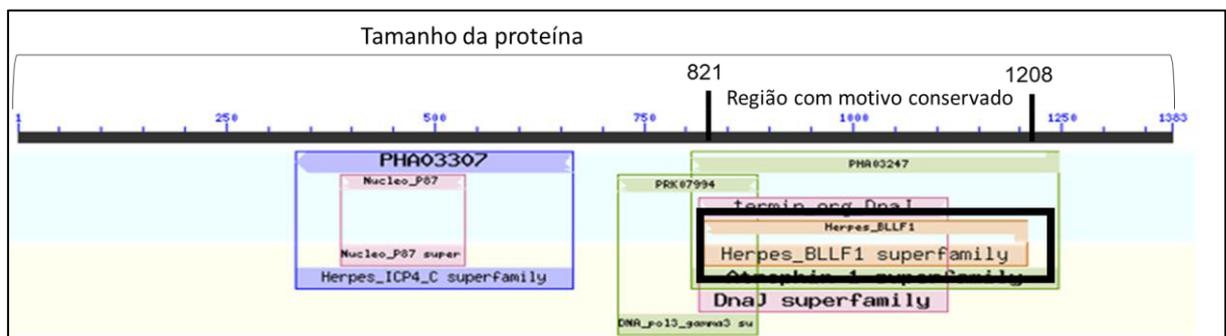


Figura 7: Representação dos motivos conservados na proteína Beta-*likep* de *T. asahii*. A caixa preta destaca a região conservada BLLF1 compartilhado com herpes vírus que indica uma possível função de adesão.

Fonte: Adaptado do NCBI.

A proteína XP_014176431.1 foi denominada de Restina-*likep* e apresentou quatro regiões conservadas, sendo pertencentes a superfamília Von Willebrand factor type A (vWA), a superfamília SSL_OB (superantígeno de *Staphylococcus* sp), a superfamília atrophin-1 e a superfamília da mucina-*like*. Destes apenas dois motivos indicaram uma possível função de adesão, o motivo vWA que está inserido entre os aminoácidos 33 ao 170, e o motivo pertencente

à família das mucinas que está localizado entre os aminoácidos 348 e 438, ambos conservados e compartilhados por organismos, (figura 8).

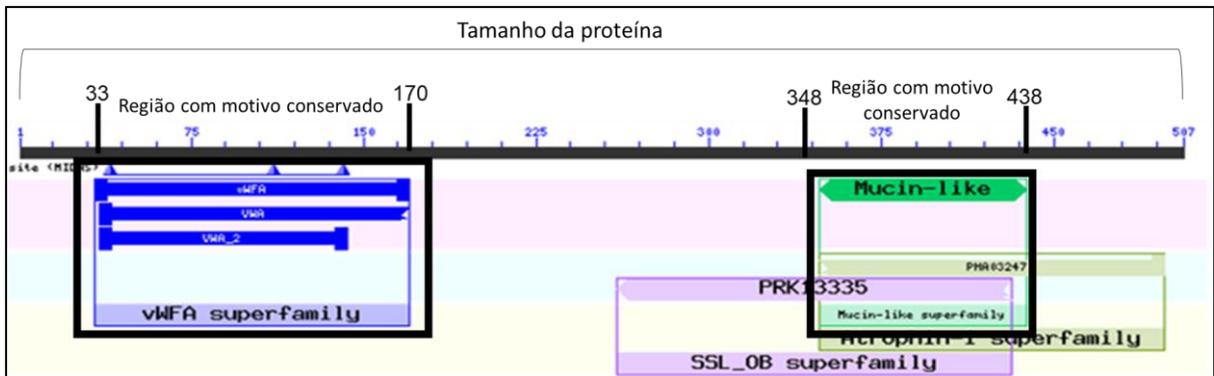


Figura 8: Representação dos motivos conservados na proteína Restina-likep de *T. asahii*. As caixas pretas destacam as regiões conservadas: a superfamília Von Willebrand factor type A (vWA) entre os aminoácidos 33 e 170, e a família das mucinas conservada entre os entre os aminoácidos 348 e 438, indicam uma possível função de adesão.

Fonte: Adaptado do NCBI.

A proteína XP_014183496.1 foi denominada de Mar-likep e apresentou três regiões conservadas compartilhadas com outros organismos, sendo pertencentes a superfamília BLLF1, a superfamília das endomucinas e a superfamília das proteínas RhoGEF. Contudo apenas os motivos conservados pertencentes a superfamília BLLF1 inseridos entre os aminoácidos 117 e 385, compartilhado com herpes vírus, e o motivo conservado pertencente a superfamília das endomucinas localizado entre os aminoácidos 204 e 343, encontrado em capilares de mamíferos, indicam possível função de adesão na Mar-likep (figura 9).

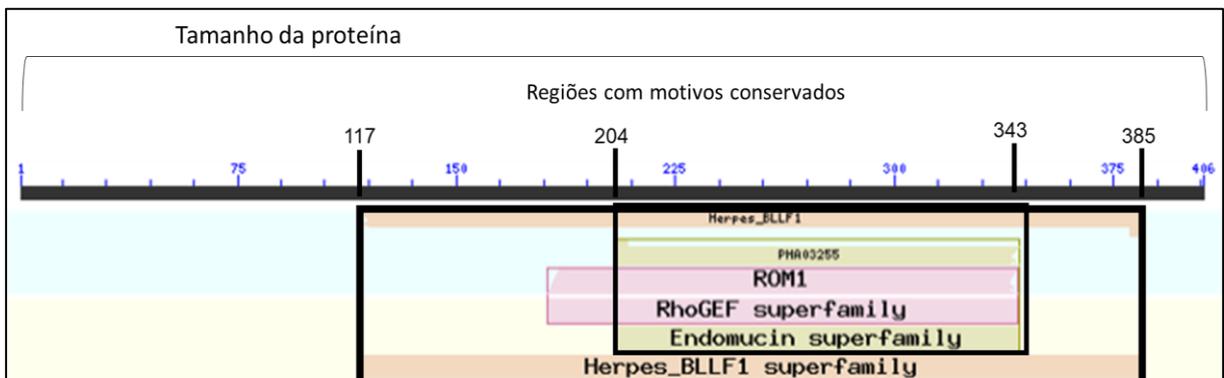


Figura 9: Representação dos motivos conservados na proteína Mar-likep de *T. asahii*. As caixas pretas destacam as regiões conservadas: a superfamília BLLF1 compartilhado com herpes vírus entre os aminoácidos 117 e 385, e a superfamília das endomucinas conservada entre os entre os aminoácidos 204 e 343, indicam uma possível função de adesão.

Fonte: Adaptado do NCBI.

A sequência de *T. asahii* (XP_014178337), denominada de CFL1-*likep*, revelada a através das comparações por tBLASTn-NCBI e a partir da adesina CFL1p de *C. neoformans*, não apresentou motivos conservados compartilhados com outros microrganismos que indicassem função de adesão. Contudo, a sequência de *T. asahii* foi mantida em nosso estudo por apresentar-se muito similar a sequência CFL1p de *C. neoformans*, a qual também não apresenta motivos conservados compartilhados com adesinas de outras espécies, mas atua funcionalmente como adesina em processos de adesão célula-célula e formação de biofilme de *C. neoformans* (WANG et al., 2012).

5.3 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS GENES CODIFICADORES DE ADESINAS DE *T. asahii* POR PCR-CONVENCIONAL

Para as amplificações, houve sucesso na extração de DNA total das quatro linhagens de *T. asahii*. As quantificações e relações de pureza do ácido nucleico (DNA) após extração com *glass beads* das quatro linhagens encontram-se descritas na tabela 7. Os índices de pureza apresentados nessa extração demonstram que o DNA total se encontrava livre de contaminantes, como proteínas e sais.

Tabela 7: Quantificações e relação de pureza do DNA após extração com *glass beads*.

Linhagem de <i>T. asahii</i>	Concentração do DNA em ng/μL	260/280	260/230
CBS2479	883,6	2,02	2,13
CBS7631	844,6	2,08	2,1
L773	1162,2	2,05	1,9
L2585	840	1,71	2,3

Fonte: Do autor.

As quatro sequências selecionadas após aplicação dos critérios de seleção, tiveram pares de *primers* desenhados para regiões específicas de suas sequências com posterior amplificação desses genes. Para isso foram necessários realizar testes de otimização da temperatura de anelamento dos *primers* para se obter melhor amplificação, sendo as temperaturas de anelamento selecionadas para *CFL1-like* 55°C, *Restina-like*, 52°C, *MAR-like* 52°C, *BETA-like* fragmento 1, 52°C, *BETA-like* fragmento 2, 52°C a 55°C e *BETA-like* fragmento 3, 52°C a 55°C.

A figura 10 mostra géis de agarose a 1% com as amplificações a partir do DNA genômico das cepas de referência CBS2479, CBS7631, L2585 e L773, e dos genes, respectivamente, *MAR-like*, *RESTINA-like*, *CFL1-like*, *BETA-like-1*, *BETA-like-2* e *BETA-like-3*, sendo que de todos os seis fragmentos, foram amplificados.

Destaca-se que durante a otimização da temperatura de anelamento dos *primers* foi notado que o fragmento dos genes da *RESTINA-like* e *BETA-like* (*BETA-like-1*, *BETA-like-3*) apresentaram bandas inespecíficas na amplificação, que não desapareceram com o aumento de temperatura.

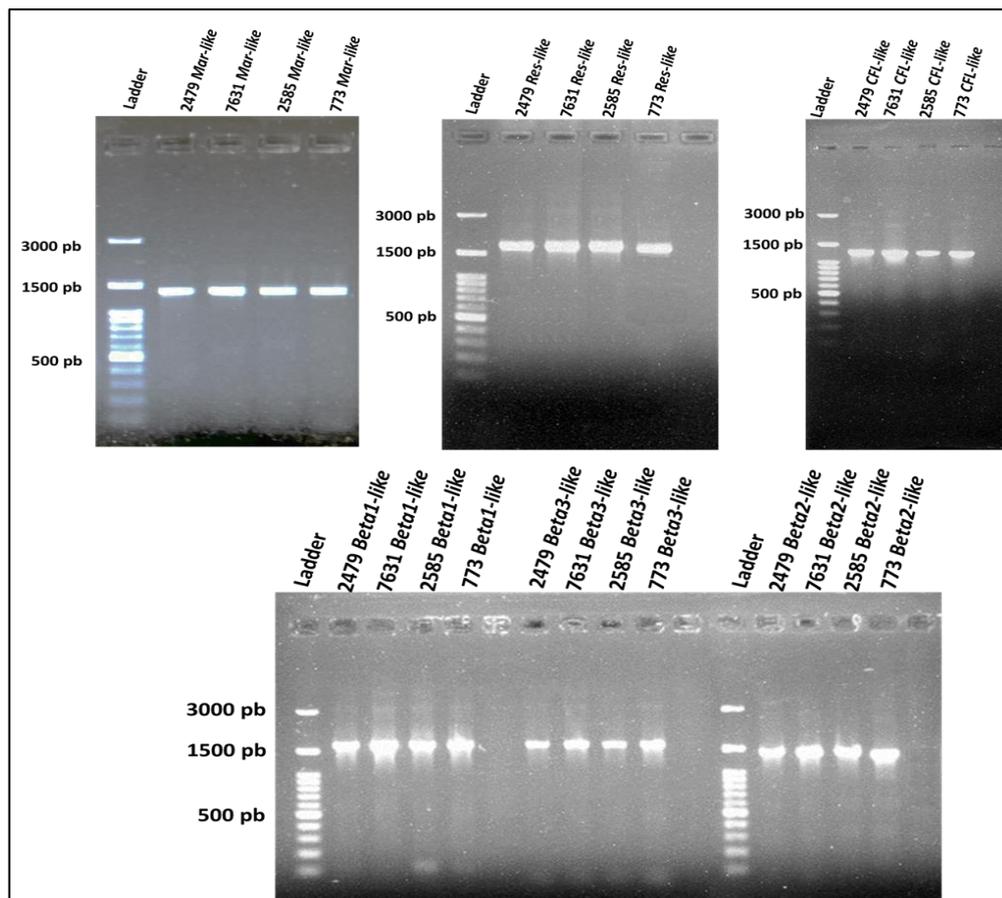


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR, genes: *MAR-like* (A), *RESTINA-like* (B), *CFL1-like* (C) e os 3 fragmentos da *BETA-like* (D) amplificados a partir do DNA das linhagens de *T. asahii* CBS2479, CBS7631, L2585 e L773.

Fonte: Do autor.

5.4 PREDIÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS PROTEICAS QUANTO AS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

A partir destas quatro adesinas selecionadas para o estudo, outras predições foram realizadas com a sequência depositada do genoma de *T. asahii* CBS2479 por meio das ferramentas do servidor *Center Biological Sequence Analysis* (CBS), a fim de se obter o máximo de informações das características estruturais e funcionais das proteínas hipotéticas.

A primeira proteína, *CFL1-like*, contém 325 aminoácidos e apresenta *O*-glicosilações em 4 resíduos de serina/treonina (ser/thr), sem predição para *N*-glicosilações, com presença de sítios de ligações de manoses em 14 resíduos de triptofano (trp) e ausência de predição para de *N*-acetilação (Figura 11).

MLFQTAAVTALLAASQAATFGLFQKWGSGGGLWDCLRPQNRPNDCSRGFWCWGNNQQLC
 SSQRTCGSPPRQTQCPQGWVHGSASCCLPKQNNQRCTCPPGYIFEGLGRQGRCIQKRSEHP
 CRDDEFWVEGKRCCANNWGDNQCKRCEEKPCPENFYLSKEGKCLPQTGGCEIRCPPGYQW
 DWNTHCCKPTGPQPSGIPKKQDNTKNHWRWRDISALTGLTELQLRDESIETVFDRTDFDRHHC
 PSDLKACMIPGEFGSAGVECVDTLNDAEFCGG

Figura 11: Predições das características da proteína *CFL1-like* de *T. asahii* CBS2479: Em amarelo os aminoácidos que recebem *O*-glicosilação e em vermelho aminoácidos manosilados

Fonte: Do autor.

A proteína *Mar-like* contém 406 aminoácidos, sendo predito 65 resíduos de serina/treonina (ser/thr) passíveis de *O*-glicosilação e 12 sítios receptivos de *N*-glicosilação, ressalta-se que para ocorrer essa última modificação faz necessário a presença de um aminoácido de asparagina (asp), um aminoácido qualquer (Xaa) e um aminoácido do tipo serina/treonina (ser/thr) (asp-Xaa-ser/thr), sendo ausentes sítios de manosilação e *N*-acetilação (Figura 12).

```

MRFSSAILFSVLGAMAGQVVAKPAAEIGELELHRRRAEMIQTEEDLLVARDQLDKRTFQLICSIKCAIP
IVNVIVSPICGCNGGGGGGGPGGTGGGDHGGDHGGDGGCHECLPDTTFFVPTPSNTGGNPNPTGGD
HGGDGGGDHGGDHGGDHGGDHGNGNPGQDGHGDNPGPDGTIITSGGPGPTNGGSTSNGPAPTSS
SNGGDNNQTSNGPAPTPTSTSEAPKPTSSSNGGDNNNTSNGGDNHTSNGGDNHTSNGGDNHTSN
GGDNHTSNGPAPTPTSTSEAPKPTSSSNGGDNNNTSNGGDNHTSNGGDNHTSNGGDNHTSNGGD
NQTSNGPAPTSSSTSEAPKPTTSGGGNNNNQCKDGDGAPGKDGQDAVCPPPCVCSRGS
EELAQENALLRREIAALKAQLA

```

Figura 12: Predições das características da proteína Mar-like *T. asahii* CBS2479: Em amarelo os aminoácidos que recebem *O*-glicosilação, as caixas destacam as asparaginas (N) passíveis de *N*-glicosilação. Sequências com aminoácido destacado em azul representam as sequências (asp-Xaa-ser/ter) de aminoácidos. Aquelas com aminoácidos destacados em vermelho são preditos como glicosilados.

Fonte: Do autor.

A proteína Beta-like contém 1383 aminoácidos com 463 resíduos passíveis de *O*-glicosilações e 21 sítios preditos para *N*-glicosilações, ressalta-se que para ocorrer essa última modificação faz necessário a presença de um aminoácido de asparagina (asp), um aminoácido qualquer (Xaa) e um aminoácido do tipo serina/treonina (ser/thr) (asp-Xaa-ser/thr), não foram preditos sítios de manosilação e *N*-acetilação (Figura 13).

```

MRFPSAGPSLVVLPLLAAQAAAAPSYRRTHPRFGKIIRPRAGGPLVEPSSAAAEASSAEATVVSASAS
ASDVASASVTSIAPEVSTSANSTSTVADAPEASNATASSGAGTSKDSGVWHAPPLINGTGHEAPESA
APEPSSNGTSSAVPIVSANATASSLPVETS DATASASAEASASASASASGEAEAEPSSEASSAASNAS
ASVSSTQSKTPTSSSRDNSGGDDTIPVAPSHDAEAVSSVQSKAAVFNTNYTNYVQQLTLTQTSAVTSTSI
MAAAAEATGGSGDIYAEAQKLAEQYVQSMMANEYGKLLPTVTLNVILEPTQEADGHWDYAVHLGNDG
THTAVPTFVPSSMPTVAAPPPKITSSSVAPAPASSSAKKGPLTATADLSGPAPSSTGSGGKNVVPENE
ENLVPAPSVNPIGGISTTNWTPKPTVANPKPTSSSKAPAPTSSSTHQADKEVPTDDSNDYTPPAPTG
GNDNSAPSAAPTQDKPAPTQDSQKPAPAPAPSSPTDNGDDNSGEEEDNGDEWEEEPSDNDNDEDG
GDWVAPAPAPATSSEASAAPAPTSEEPAPEPSAAPAPSNGQESSGYSESTEQSVVATASATSSDSA
GPSASESASPSVSAEPNVSAEPSASVEPSVSAEPSAAEYSTSAEPSTSATAEISSKPSASAEPSSAES
SASAEVTESTGSAIASASASATPSATSSAPDVEQPADPEVSSEPSVSASASASASSDVSVVQPTVSAS
SNATASPEPTASSAEPSAEPSAASASAEVSASASAEPSASASAEPSASATESSAEPSAATESA
EPSYSAEPSATPSAETPDDAPSTSAEASATPSAEVSAEPSAEPSATESSAEASAEPTAPSTSVEESED
GISTTYTTSWTTVNVTMTRDPQPTGNASASDSSVVPSATLLPETEPTVSSNSTELPSPTGNSTELPSVS
GNSTEVPTSTGNWTELPIETGNITEPSASSPSSNATASAEPTPSANATSVLPEPSANVTSSVEPSPSA
NVTSALPSPSANVTSSVEPSPSANATSALPSPSANATSAEPSPSANATSVLPSPSANATSSVEPSPSA
NATSAEPSPTGNVTAPIEPSPSASASANATSAEPSPPSANASASVEPSPSANVTSALPSPSANAT
SVEPSPSANATIPSPSTSASANVTSSVEPSPSASANVTSSVEPSPSANAAISASASASSPPSANATSS
VEPPSPSANVTSSVLPPSPSASSSAESSSASASATSSASASSPSSATPSSSESASASASSSASASA
SASESASESASASSSFASVSASASSSAEASASSPATSSGAEPSATDGEFCERDYTDEEYEEIW
VYEDEIQEGDILQ

```

Figura 13: Predições das características da proteína Beta-like *T. asahii* CBS2479: Em amarelo os aminoácidos que recebem *O*-glicosilação, as caixas destacam as asparaginas (N) passíveis de *N*-glicosilação. Sequências com aminoácido destacado em azul representam as sequências (asp-Xaa-ser/ter) de aminoácidos. Aquelas com aminoácidos destacados em vermelho são preditos como glicosilados.

Fonte: Do autor.

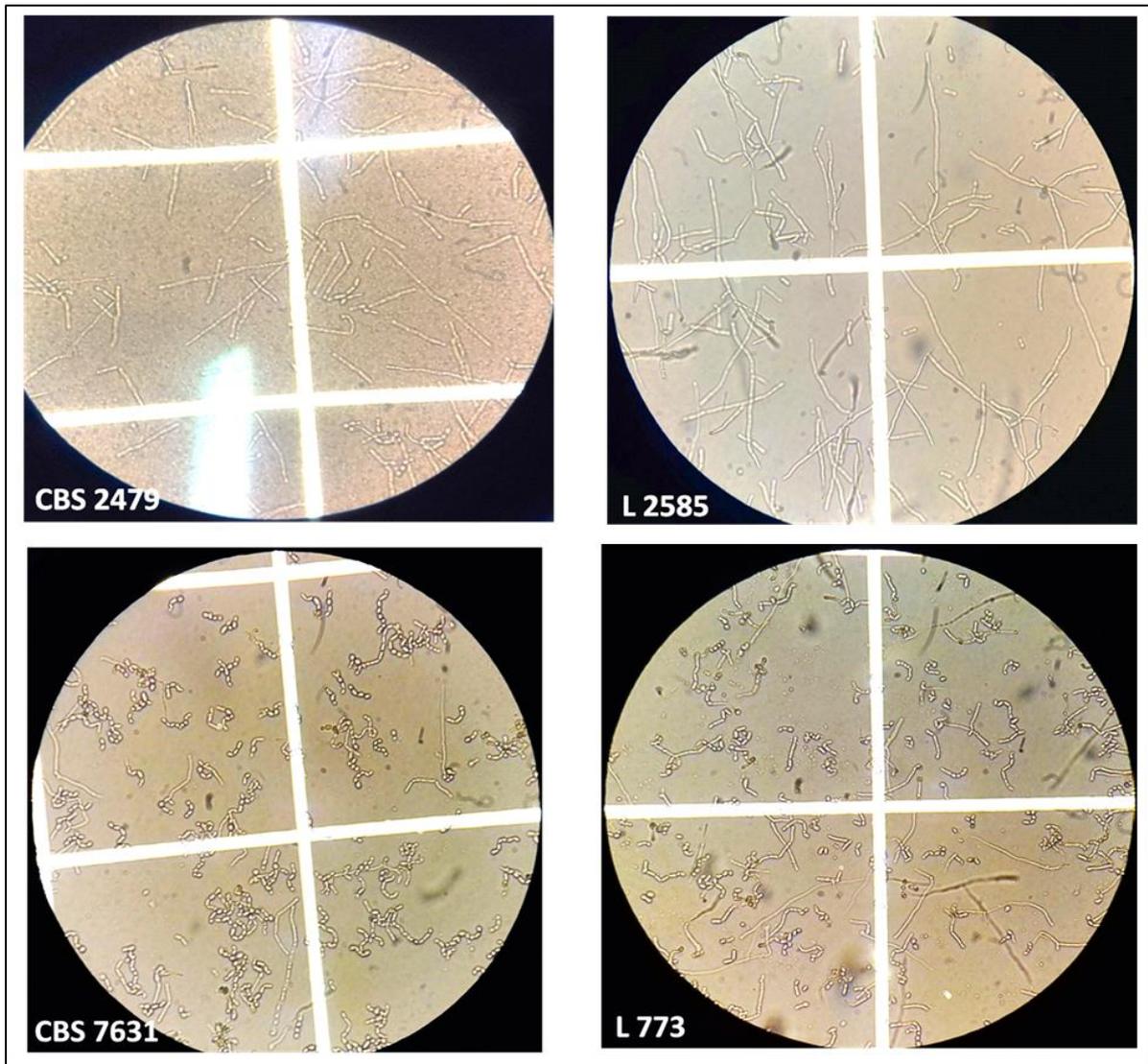


Figura 15: Observação das morfologias de duas linhagens de *T. asahii* em microscópio óptico no aumento de 400 vezes na câmara de Neubauer, após o cultivo planctônico em meio cultura RPMI-1640. Os isolados *T. asahii* CBS2479 e L2585 apresentaram crescimento predominante na forma de hifas, enquanto os isolados *T. asahii* CBS7631 e L773, apresentaram crescimento predominante de artroconídeos.

Fonte: Do autor.

Para a realização da RT-PCR, observou-se sucesso na extração de RNA total das quatro linhagens de *T. asahii*. As quantificações e relação de pureza sendo o mais próximo ou maiores de 1,8, mostram RNAs livres de contaminantes e poder ser observados na tabela 8. Os índices de pureza apresentados nessa extração demonstram que o RNA total se encontrava livre de contaminantes, como proteínas e sais.

Tabela 8: Quantificações e relação de pureza do RNA após extração com *glass beads*.

Linhagem de <i>T. asahii</i>	Concentração do RNA em ng/μL	260/280	260/230
CBS2479	912,4	1,92	1,83
CBS7631	566,1	2,03	1,64
L773	654,5	1,88	1,73
L2585	369	2,05	1,92

Fonte: Do autor.

Após o sucesso na extração, a qualidade do RNA extraído foi verificada a partir de eletroforese com gel de agarose a 0,8% (Figura 16A). Foram aplicados 5 μ g por poço e se observou a presença de RNA integro de todos os isolados, verificou-se grande quantidade de DNA presente nas amostras.

Após o tratamento desses RNA com a enzima DNase RQ1, foi realizado uma PCR convencional utilizando os *primers* da actina e amostras tratadas dos quatro isolados para verificar a presença de DNA residual. Observou-se que não ocorreu nenhuma amplificação no RNA dos isolados que foram tratados com DNase, assegurando que essas amostras estão livres de DNA, deste modo não influenciando na análise da expressão gênica (Figura 16B).

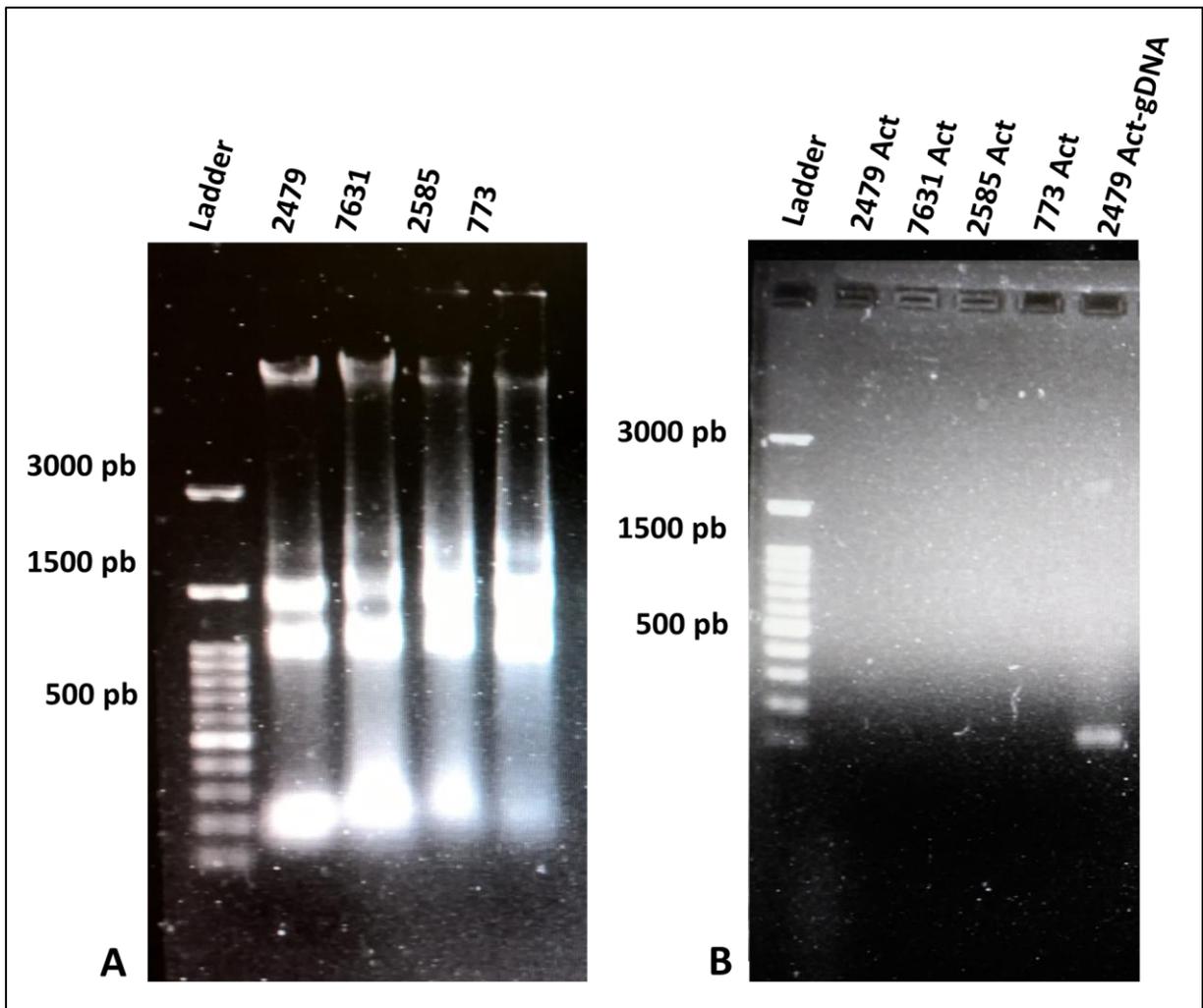


Figura 16: Análise qualidade das amostras de RNAs extraídas dos quatro isolados. (A): Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do RNA extraído dos isolados de *T. asahii* CBS2479, CBS7631, L2585 e L773. (B): Eletroforese em gel de agarose a 1% após PCR convencional utilizando RNA tratado com DNase das quatro linhagens de *T. asahii*. O DNA genômico da linhagem CBS2479 foi utilizado como controle positivo.

Nota: Act: Actina, pb: Pares de base, gDNA: DNA genômico.

Fonte: Do autor.

5.6 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ADESINAS EM CRESCIMENTO PLANCTÔNICO

Após a extração e tratamento do RNA das quatro linhagens foi realizada a síntese do cDNA normalizado para 1 μ g, além disso foram realizados testes de todos os *primers* desenhados para expressão gênica por meio de PCR convencional, empregando o DNA genômico da linhagem de referência CBS2479.

Em seguida foram realizados a análise da expressão gênica por RT-PCR e se observou que todos os genes hipotéticos (*MAR-like*, *RESTINA-like*, *CFL1-like* e *BETA-like*) foram amplificados (Figura 17 A, B e C).

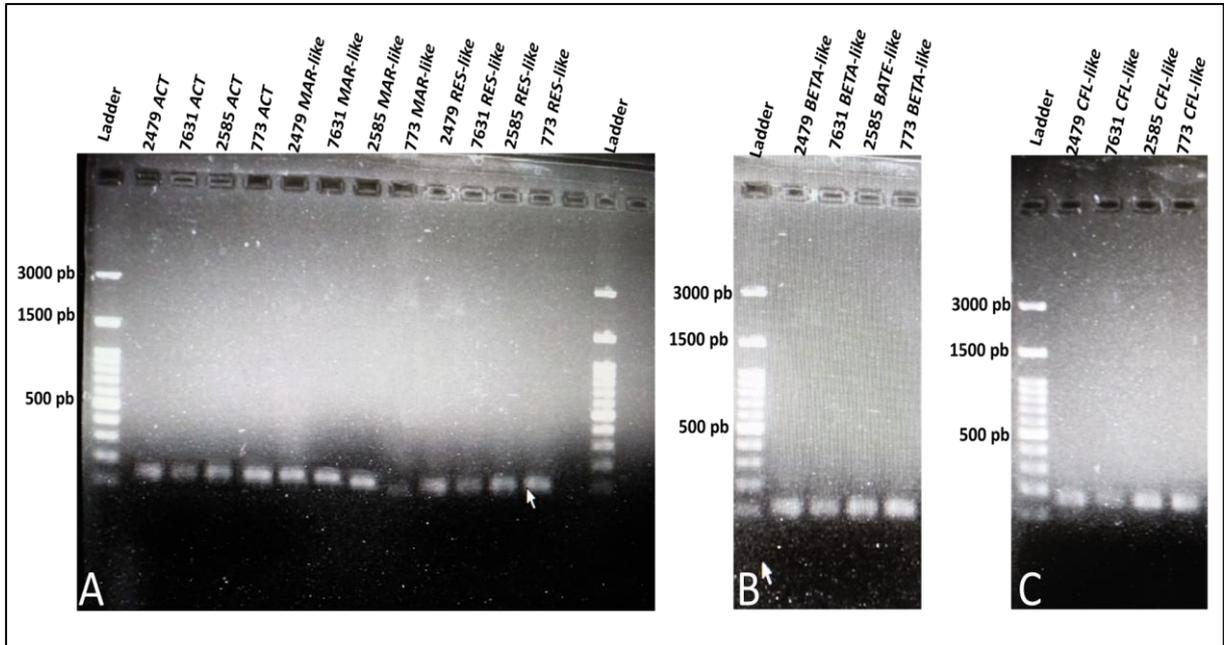


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da RT-PCR dos genes: β -ACTINA, *MAR-like*, *RES-like* (A), *BETA-like* (B) e *CFL1-like* (C). Dos quatro isolados de *T. asahii* CBS2479, CBS7631, L2585 e L773.

Nota: ACT: β -ACTINA, pb: Pares de base.

Fonte: Do autor

Para realizar as análises de expressão gênica comparativa, foram estabelecidos dois grupos de comparação, sendo o primeiro em relação ao sítio de isolamento, pois a linhagem CBS2479 é proveniente de micose superficial, enquanto as demais (CBS7631, L2585 e L773) são provenientes de hemocultura, e o segundo, entre os 3 isolados provenientes de hemocultura em relação a sua classificação de capacidade de formação de biofilme, pois sabe-se por trabalhos já publicados que a linhagem L773 é baixa formadora de biofilme, a CBS7631 é média formadora, e a L2585 é alta formadora de biofilme.

Em relação aos sítios de isolamento (micose superficial vs hemocultura), foi verificado que o gene *MAR-like* esteve expresso em todas as linhagens, tendo maior nível de expressão na linhagem de referência CBS2479, seguido da CBS7631, L2585 e L773. Além disso, observou-se que ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) de expressão desse gene entre as linhagens CBS2479 (micose superficial) com a linhagem clínica L773 (hemocultura), e a primeira em relação a L2585 (hemocultura).

Não ocorreu diferença estatística significativa de expressão quando se realizou a comparação entre a linhagem CBS2479 (micose superficial) em relação a linhagem CBS7631 (hemocultura) (Figura 18A).

Ao analisar a expressão gênica comparativa entre o isolado de micose superficial (CBS2479) em relação aos isolados de hemocultura (CBS7631, L773 e L2585) do gene *RESTINA-like*, verificou-se novamente a expressão em todas as linhagens e maior nível de expressão na cepa de referência CBS2479, proveniente de micose superficial, do que nas outras linhagens, que são provenientes de hemocultura. O gene *RESTINA-like* foi significativamente mais expresso ($p < 0,05$) na linhagem CBS2479 em relação a expressão do mesmo nas outras linhagens (Figura 18B).

O terceiro gene *BETA-like* ao ser analisado, demonstrou-se expresso em todos os isolados *T. asahii*, sendo mais expresso na linhagem de referência CBS2479, seguida das linhagens de hemocultura L773, CBS7631 e por último a L2585. Da mesma forma que a análise de expressão anterior, constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$) de expressão desse gene na linhagem de referência CBS2479 em relação as demais, proveniente de hemocultura (Figura 18C).

No último gene analisado, *CFLI-like*, observou-se um fenômeno diferente de expressão não relacionada ao sítio de isolamento. Na comparação entre as linhagens, verificou-se que o gene *CFLI-like* foi significativamente ($p < 0,05$) mais expresso na linhagem clínica L773, proveniente de hemocultura, do que na cepa de referência de micose superficial (CBS2479) e nas outras 2 linhagens de hemocultura. Já na comparação entre a cepa CBS2479 e as outras linhagens de hemocultura, não foram observadas diferenças significativas (Figura 18D).

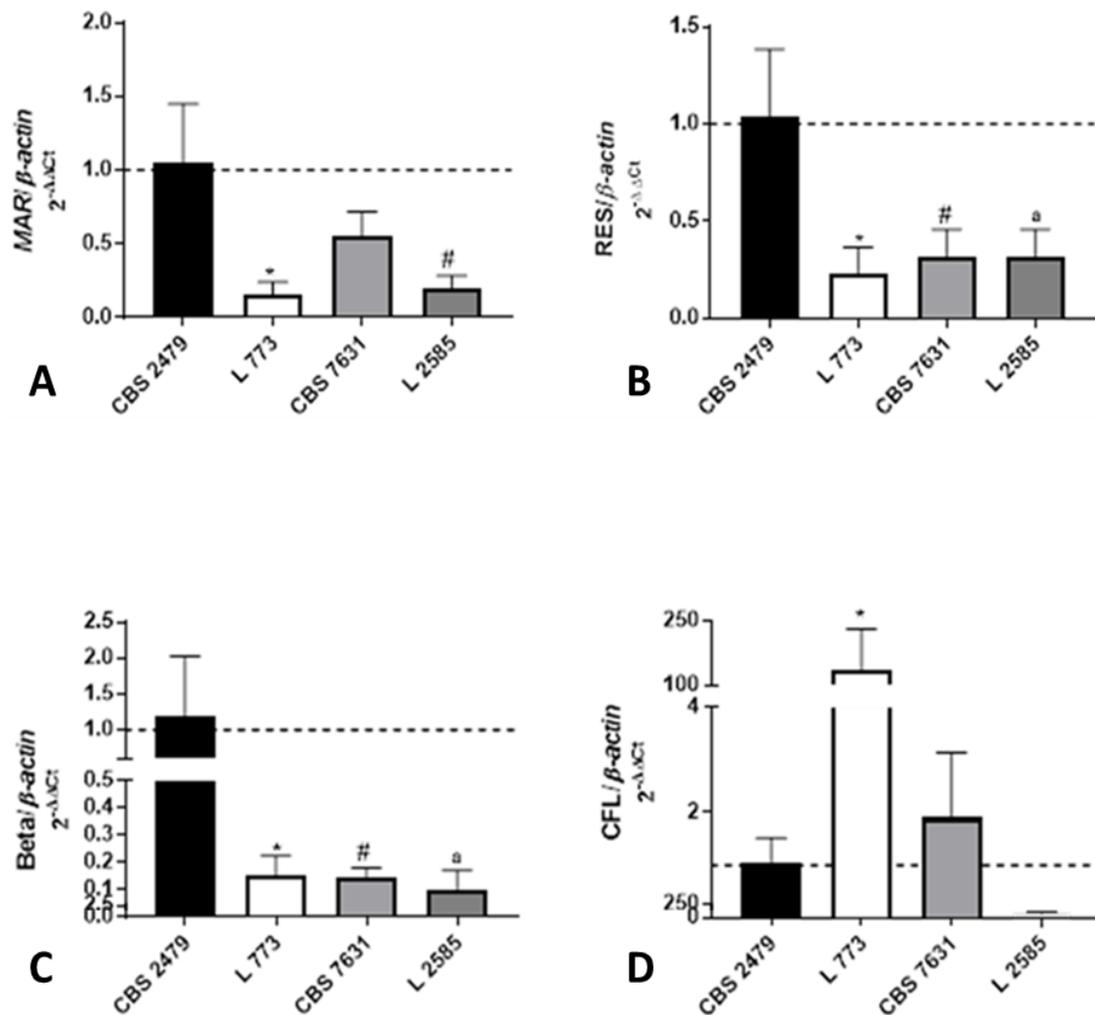


Figura 18: Comparação da expressão gênica em relação ao sítio de isolamento entre as linhagens de *T. asahii* CBS2479 (Mucose superficial) vs CBS7631, L773 e L2585 (Hemocultura). Gene *MAR-like* (A), *CBS2479 vs L773 e #CBS2479 vs L2585, $p < 0,05$. Gene *RESTINA-like* (B), CBS2479 vs Hemocultura, $p < 0,05$ para todas as comparações. Gene *BETA-like* (C), CBS2479 vs Hemocultura, $p < 0,05$ para todas as comparações. Gene *CFLI-like* (D), *CBS2479 vs L773, $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

O segundo grupo de expressão gênica analisado foi entre os 3 isolados de hemocultura, tendo como base comparativa a sua classificação de capacidade de formação de biofilme, lembrando, que a linhagem L773 é baixa formadora de biofilme, a CBS7631 é média formadora, e a L2585 é alta formadora de biofilme.

Na análise do gene *MAR-like* foi verificado que este gene foi mais expresso na linhagem CBS7631 (médio formador de biofilme), seguida das linhagens L2585 (alto formado de

biofilme) e L773 (baixo formadora de biofilme). A análise comparativa revelou diferença significativa ($p < 0,05$) entre a linhagem CBS7631 vs L773 e CBS7631 vs L2585. Contudo não ocorreu diferença significativa na expressão gênica entre os isolados clínicos L773 e L2585 (Figura 19A).

O segundo gene analisado foi *RESTINA-like* cuja expressão apresentou-se semelhante ao gene *MAR-like*, sendo mais expresso na linhagem de referência CBS7631 (médio formador de biofilme), seguida da 2585 (alto formador de biofilme) e L773 (baixo formador de biofilme). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) de expressão entre a linhagem de referência CBS7631 vs L773. Embora a expressão na cepa CBS7631 apresentasse mais elevada que na linhagem L2585, a comparação não apresentou significância estatística ($p > 0,05$). Também não se observou diferença significante ($p > 0,05$) de expressão entre as linhagens L773 com a L2585 (Figura 19B).

Com relação ao gene *BETA-like*, verificou-se que este foi mais expresso na linhagem L773 (baixo formador de biofilme), seguido por CBS7631 (médio formador de biofilme) e L2585 (alto formador de biofilme). Embora o gene tenha sido expresso em todas as linhagens, e encontre-se ativo nos mesmos, estatisticamente não ocorreu diferença significativa de expressão na comparação realizada entre os três isolados de hemocultura, como pode ser observada na figura 19C.

Por fim, foi analisado o gene *CFLI-like*, presente em todos os isolados, mas menos expresso do que os demais genes de adesinas putativas. Na comparação da expressão gênica entre os isolados de hemocultura, não foi observada diferença significativa. Porém o gene encontra-se ativo nas linhagens em questão, em crescimento planctônico, mesmo no isolado L2585 (Figura 19D).

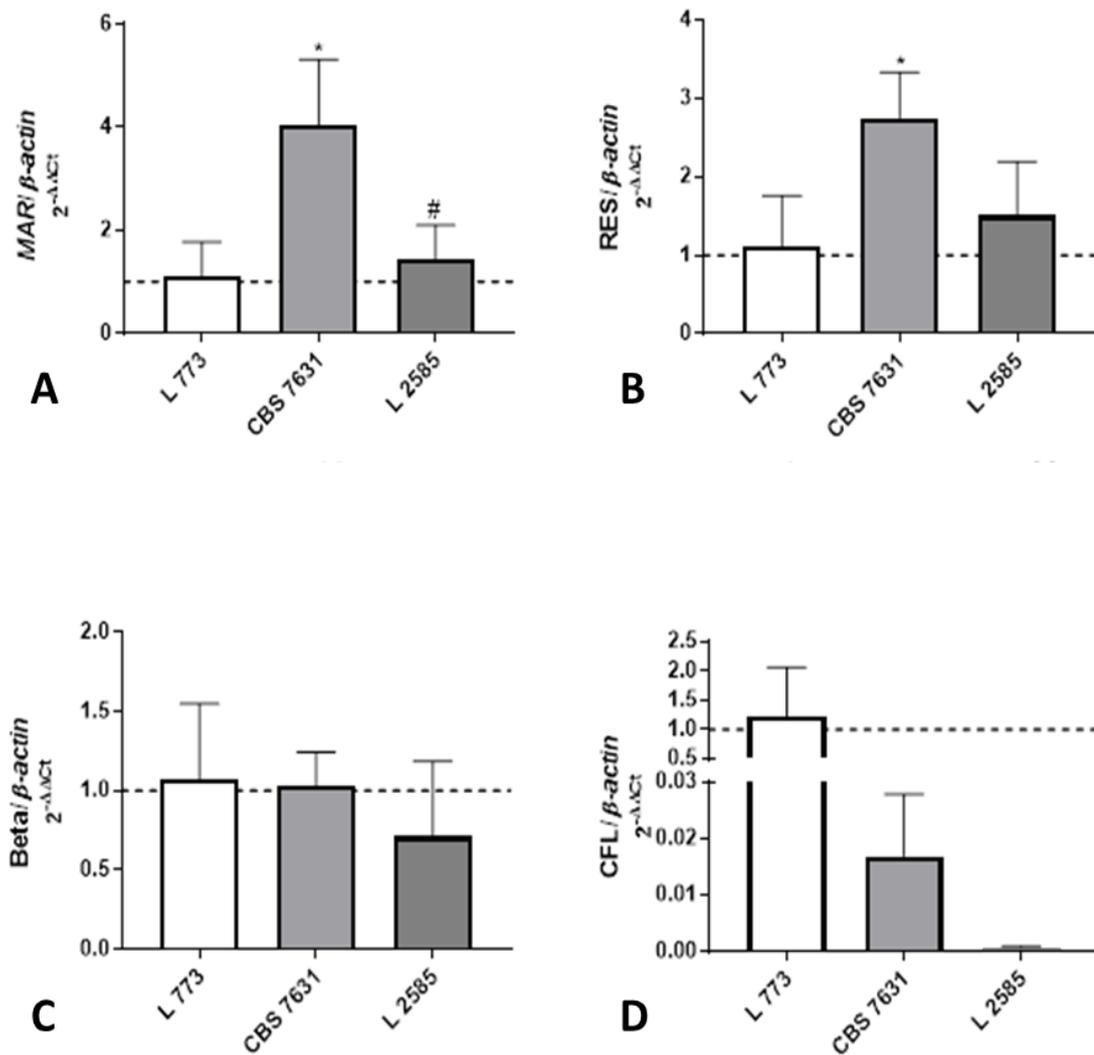


Figura 19: Análise da expressão gênica entre os isolados de hemocultura, tendo como base comparativa a sua classificação em relação a formação de biofilme ((CBS7631: Médio formador de biofilme), (L773: Baixo formador de biofilme) e (L2585 alto formador de biofilme)). Gene *MAR-like* (A), *L773 vs CBS7631 e #CBS7631 vs L2585, $p < 0,05$. Gene *RESTINA-like* (B), *L773 vs CBS7631, $p < 0,05$. Gene *BETA-like* (C) e Gene *CFL1-like* (D), não ocorreram diferenças significativas entre os isolados.

Fonte: Do autor.

6. DISCUSSÃO

Trichosporon asahii é uma espécie emergente em infecções invasivas, com altos índices de mortalidade dos pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles com doenças hematológicas malignas. (COLOMBO et al., 2011; PFALLER et al., 2009). Muitas dessas infecções estão relacionadas a formação de biofilmes em cateteres, o que confere as células fúngicas o aumento de resistência aos diferentes tratamentos e escape de células persistentes para os tecidos do paciente (COLOMBO et al., 2011; NOBILE et al., 2008; PADOVAN et al., 2009; SCHILD et al., 2011). Na formação de biofilmes há a expressão de proteínas de superfície celular, denominada de adesinas, as quais permitem interações com o meio e com o hospedeiro (DUTTON et al., 2016; SARDI et al., 2014), em *T. asahii*, essas adesinas nunca foram caracterizadas.

Para identificar possíveis sequências de adesinas em *T. asahii*, empregou-se ferramentas de predições, para análise do proteoma total da cepa de referência CBS2479. Os programas utilizados para classificação das sequências de proteicas, foram validados com banco de dados contendo adesinas conhecidas de fungos em geral (*Faapred*) e apenas com fungos patogênicos (*FungalRV*) (CHAUDHURI et al., 2011, RAMANA; GUPTA, 2010). Na validação de suas predições, dentre 32 adesinas, no *Faapred* foram reconhecidas 31 destas. Já no programa *FungalRV*, quando avaliado um conjunto de 312 proteínas provenientes de fungos patogênicos, houve 100% de identificação das adesinas pertencentes a sete espécies fúngicas (CHAUDHURI et al., 2011; RAMANA; GUPTA, 2010).

Após empregarmos as três ferramentas de busca de adesinas utilizando proteoma completo de *T. asahii* contendo 8.300 proteínas, tBLASTn, *Faapred* e *FungalRV*, foram obtidas 17 sequências com função putativa de adesina, sendo preditas em pelo menos dois dos três algoritmos de busca. Nas mesmas, foram aplicados critérios adicionais de seleção, como predição de peptídeo sinal, presença de motivos conservados que indicassem função de adesão, cadeia composta por 300 aminoácidos ou mais e não ser integrada à membrana plasmática, tendo sido selecionadas, quatro sequências proteicas: *CFL1-like*, *Beta-like*, *Mar-like* e *Restina-like*.

No presente estudo, para a seleção das adesinas, um critério considerado foi a presença de peptídeo sinal, também denominada de sequência sinal. Esta sequência faz o direcionamento da proteína para o Retículo endoplasmático (NILSSON et al., 2014). Esse direcionamento foi evidenciado no modelo de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que a condução das proteínas

recém-sintetizadas para o Retículo Endoplasmático (RE) é mediada por proteínas denominadas de partículas de reconhecimento de sinal (SRP), pois estas ligam-se à sequência sinal. Ao serem enviadas para o Reticulo Endoplasmático, passam por importantes modificações pós-traducionais, como por exemplo, glicosilações, manosilações e acetilações, e são então, transportadas por via clássica para outras regiões da célula (BYRON et al., 1991; Brown et al., 1975).

Algumas dessas modificações pós-traducionais foram preditas nas quatro adesinas selecionadas, sendo que todas as sequências apresentaram resíduos de aminoácidos (serina, treonina e asparagina) passíveis de serem modificados por *O*-glicosilação e *N*-glicosilação. O primeiro processo envolve reações entre os grupos OH do aminoácido serina/treonina com os grupos do carboidrato, e no segundo processo ocorre interação do grupo NH₂ da asparagina com os radicais do carboidrato. Essas modificações são importantes para aumentar a estabilidade da proteína, e diminuir o risco de degradação enzimática, corroborando principalmente para manter a arquitetura celular (FERNANDES, 2008; GOTO, 2007).

Essas glicosilações são comuns em diversas adesinas, como por exemplo, aquelas codificadas pelos genes *ALS* (*Agglutinin-Like Sequence*) no gênero *Candida*, as quais apresentam regiões nucleotídicas conservadas entre si. Em estudo realizado por Hoyer et al (1998) envolvendo as proteínas Als2p e Als4p, foi demonstrado que as mesmas são altamente *O*-glicosiladas, e que essas glicoproteínas variam em tamanho e em quantidade na superfície celular. Ademais, outras proteínas de superfície celular apresentam essas mesmas características de *O*-glicosilação, principalmente nas regiões ricas em serina e treonina, como por exemplo nas Als6p e Als7p em *C. albicans* (HOYER, et al, 2000). As glicosilações foram encontradas na proteína Hyr1p (*hyphally regulated gene HYR1*) de *Candida* sp. (BAILEY et al., 1996), e em proteínas do tipo floculinas (Flo) em *Saccharomyces cerevisiae* (BONY et al., 1997).

A modalidade de *N*-glicosilação ocorrerá em resíduos de asparagina, para isso se faz necessário um triplete de aminoácidos, sendo uma asparagina ligada a um aminoácido qualquer que encontra ligado a uma serina ou treonina (asp-Xaa-ser/thr). Esta característica foi predita em duas das quatro sequências proteicas selecionadas no presente estudo, *Mar-like* e *Beta-like*. Essa modificação já foi relatada em diferentes proteínas de superfície celular com função de adesina, como por exemplo Als2p, Hyr1p e Flo1p (BAILEY et al., 1996; BONY et al., 1997; HOYER et al., 1998). Essas propriedades químicas que permitem aos aminoácidos serem modificados por glicosilação estão relacionados com os diferentes tipos de interações celulares

que ocorrerá entre a célula fúngica e o meio, demonstrando o papel relevante de adesão dessas proteínas (BAILEY et al., 1996; BONY et al., 1997; HOYER et al., 1998).

Outra modificação pós-traducional comum em adesinas é a manosiilação do aminoácido triptofano, sendo este açúcar muito encontrado na parede celular de muitas blastoconídeos, (GOOSSENS; WILLAERT, 2012). As análises mostraram que duas das sequências, *Restina-likep* e *CFL1-likep*, apresentavam sítios para ocorrência desta modificação. Algumas adesinas do tipo floculina (Flo1p, Flo5p, Flo9p e Flo10p) de *S. cerevisiae* podem receber as ligações com carboidratos de manose, como relatado por Goossens e Willaert (2012).

Por último, foi realizada a predição de sítios de acetilação nas quatro adesinas selecionadas, revelando que não apresentavam acetilação. Esse fato pode ser explicado por meio dos achados nos estudos de Brown et al (1975), que ao analisar o conteúdo citoplasmático de um grupo células neoplásicas, conclui que 80% dessas proteínas são acetiladas. Segundo Forte et al (2011), ao estudar essas modificações em *S. cerevisiae*, conclui que a cadeia proteica que passa por acetilação pode ter sua translocação para o Retículo endoplasmático inibida, processo comum de ocorrência nas proteínas citoplasmáticas. Observou ainda que as proteínas que apresentavam a sequência sinal (peptídeo sinal), exibiam uma polarização para o não processamento da região *N*-terminal da cadeia, que recebe a modificação de acetilação. Esses dados corroboram para reforçar que as sequências selecionadas, seguem o caminho clássico de modificação e secreção mediada pela sinalização da sequência sinal.

Outro tipo de análise realizada em nosso estudo foi baseado no tamanho das sequências proteicas e na localização, cuja predição revelaria a presença de hélices transmembrana, indicando se as proteínas estariam localizadas na membrana plasmática, desta forma não se apresentando totalmente exposta na superfície celular (MITTAL; SINGH, 2017; MITTAL; SINGH, 2016). Em nossas predições, as quatro sequências não apresentaram hélices transmembrana e todas eram compostas por mais de 300 aminoácidos, sendo a menor das cadeias composta por 325 aminoácidos (*CFL1-likep*) e a maior delas, composta por 1383 aminoácidos (*Beta-likep*). Os tamanhos das sequências selecionadas reforçam que todas elas poderiam atravessar a parede celular e serem de alguma forma expostas para o meio, promovendo a interação entre células e célula-substrato. Esse fato pode ser respaldado no tamanho apresentado por outras adesinas já descritas na literatura em outras espécies fúngicas, cuja função de adesão já foi comprovada, como por exemplo, a CFL1p (309 aminoácidos) de *C. neoformans*, a qual é necessária para a adesão celular e formação de biofilme (WANG et al., 2012), e em *C. albicans*, que são encontradas as proteínas IFF11, Ywp1/Pga24 e HWP1

(respectivamente 511, 533 e 634 aminoácidos) cujas funções estão relacionadas com adesão e formação de biofilme em diferentes substratos (BATES et al., 2007; ENE; BENNETT, 2009; GRANGER et al., 2005).

Outro critério relevante para nossa seleção foi a localização de regiões ou motivos proteicos que indicassem alguma função de adesão. Nas análises realizadas, a proteína CFL1-like de *T. asahii* não revelou motivos conservados que indicassem função de adesão, entretanto ela foi mantida devido a sua similaridade com a adesina CFL1p de *C. neoformans*, que também não apresenta motivos de adesinas conhecidas em fungos (dados não mostrados), e também tem ausência de regiões ricas em serina e treonina. Contudo, sabe-se que a mesma desempenha funções consistentes de adesinas, como mediar a interação célula-célula, adesão em ágar com formação de colônias enrugadas, bem como a formação de biofilmes (GYAWALI et al., 2017; WANG et al., 2012). Vale ressaltar que até o presente momento, a CFL1p de *C. neoformans* é a única proteína com função de adesina descrita no filo Basidiomycota. Recentemente Gyawali e seus colaboradores (2017) descreveram quatro genes (*DHA1*, *DHA2*, *CPL1* e *CFL105*) em *C. neoformans* que são homólogos a CFL1p, porém, estes desempenham diferentes funções e são expressos em momentos específicos do crescimento fúngico, como por exemplo a *DHA2*, que é expresso no estado leveduriforme. (GYAWALI et al., 2017).

A proteína Beta-like, por meio das buscas realizadas pelo BLASTp, revelou a presença de motivos conservados de interação de microrganismo com o hospedeiro humano. Uma de suas regiões é composta por cerca de 390 aminoácidos, entre os aminoácidos 821 e 1208, sendo compartilhada com herpes vírus. Neste vírus, essa região conservada pertence a família BLLF1 (gp 350/220), que é uma glicoproteína de envelope e um importante antígeno (GOOSSENS; WILLART, 2012; JANZ et al., 2000). Segundo Janz e seus colaboradores (2000), essa glicoproteína medeia a ligação do vírus com a célula alvo. Uma outra característica que leva o nome da proteína são as folhas-beta que são domínios ricamente O-glicosilados e encontrados na família das floculinas, como a adesina Flo11p de *S. cerevisiae* (GOOSSENS; WILLAERT, 2012).

Coincidentemente, a proteína Mar-like, que na anotação do genoma de *T. asahii* aparece como uma sequência S-antígeno, também revelou a presença de motivos conservados compartilhados com a família BLLF1 (gp 350/220) de herpevírus, sendo esta região composta por cerca de 268 aminoácidos localizados entre 117 a 385 (JANZ et al., 2000). Outra região conservada revelada, pertence à família das endomucinas, estas proteínas são altamente

glicosiladas e são expressas em capilares, e dependendo do tipo de glicosilação auxiliam no processo de adesão, contribuindo para a ligação das selectinas (SAMULOWITZ et al., 2002)

Análises da proteína *Restina-like* revelou a presença de motivos conservados, sendo um destes um domínio von Willebrand A (VWA) entre os 35 e 170, que conhecidamente está envolvido na adesão celular em proteínas da matriz extracelular e nos receptores de integrina de diferentes organismos (WHITTAKER; HYNES, 2002). Além disso, essa proteína de *T. asahii* apresentou outro domínio conservado entre os aminoácidos 348 a 448, altamente *O*-glicosilado, denominado de mucina, que é um glicoconjugado, altamente glicosilado, sendo um componente chave de secreções mucoides, cuja função é revestir o epitélio mucoso de muitos animais e com superexpressão associada a diferentes tipos de câncer (Johansson et al., 2008).

Após a seleção dos genes e posterior amplificação completa das *ORFs* dos mesmos por PCR convencional em todos os isolados analisados, embasou a hipótese da real existência desses genes, que até o presente momento, permaneciam anotados como hipotéticos. Com a amplificação de cDNAs dos quatro genes através da RT-PCR nos quatro isolados, se admite afirmar que não se tratam de *ORFs* hipotéticos, mas sim, de genes presentes de forma conservada em genomas de diferentes isolados, bem como, expressos pelas células quando em crescimento planctônico.

Foi verificado o padrão de expressão entre as linhagens, que determinados genes (*MAR-like*, *RESTINA-like* e *BETA-like*) se encontravam mais ativos na cepa CBS2479 que foi isolada a partir da pele (micose superficial) do que nas linhagens que eram provenientes de hemocultura. E nos isolados de hemocultura CBS7631, a L773 e a L2585, observou-se um padrão de expressão dos quatro genes (*MAR-like*, *RESTINA-like*, *CFLI-like* e *BETA-like*).

Ao analisar o padrão de expressão entre as linhagens obtidas de diferentes sítios de isolamento, verificou-se que os genes *MAR-like*, *RESTINA-like* e *BETA-like* se encontravam mais expressos na cepa CBS2479, isolada a partir da psoríase (micose superficial), do que nas linhagens provenientes de hemocultura, diferentemente do gene *CFLI-like*, que aparentemente, tem sua expressão regulada pela morfologia das células e não necessariamente pelo sítio de isolamento.

A expressão diferencial de genes de adesinas está relacionada com o estabelecimento e adesão do fungo ao substrato. Sheppard e seus colaboradores (2004) mostraram que *S. cerevisiae* transformado com diferentes adesinas de *C. albicans*, apresentavam diferenças quantitativas na aderência a diferentes substratos, e ainda, as adesinas apresentavam graus diferentes de afinidade por determinado substrato. Como exemplo, células expressando a Als1p

apresentavam maior adesão com a fibronectina, enquanto tinham menor afinidade de adesão por células epiteliais. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que células expressando a Als6p tinham mais afinidade para se ligar ao meio contendo gelatina e que células expressando Als9p apresentavam maior adesão com laminina do que por outros compostos (SHEPPARD et al., 2004).

Prosseguindo nessa linha relacionada com o substrato, Nailis et al (2010) estudou a expressão de algumas adesinas de *C. albicans* em biofilmes, como por exemplo, aquelas pertencentes às famílias gênicas *HWPI* e *ALS*. Eles demonstraram que *HWPI* apresentou-se superexpresso em modelo *in vivo*, após indução do crescimento do fungo em cateter subcutâneo inserido em camundongo. Contudo, o mesmo gene não foi expresso no modelo de crescimento *in vitro* em placas de silicone (NAILIS et al., 2010).

Diante do exposto, o tipo de nicho ou substrato pode ter influenciado na diferença de expressão observada para a linhagem CBS2479, proveniente de micose de pele. Uma vez que seu ambiente de isolamento selecionaria uma maior expressão de adesinas para mantê-la aderida ao substrato epitelial, o mesmo não ocorreria nas linhagens proveniente de hemocultura, pois no sangue, encontram-se livres e em constante circulação.

Em relação as análises comparativas entre as 3 linhagens de *T. asahii* provenientes de hemocultura que possuem diferentes graus de produção de biofilme sobre plástico, não foi observada relação entre alta expressão de adesinas com alta formação de biofilmes, ou baixa expressão das adesinas com baixa produção de biofilmes. Pode-se especular pelo menos duas hipóteses para explicar as observações deste trabalho: (i) a morfologia das células em estado planctônico pode determinar a expressão dos genes selecionados em nosso estudo, uma vez que foi observado que as células das linhagens CBS7631 e L773, que apresentaram crescimento predominante de artroconídeos, expressaram mais os diferentes genes de adesinas em relação à linhagem L2585, cujo crescimento predominante foi na forma de hifas; (ii) o crescimento em estado planctônico não remonta o fenótipo das células em crescimento de biofilme, ou seja, é necessário o contato com o substrato para modular diferenças na expressão gênica de isolados capazes de formar mais ou menos biofilmes dependendo, inclusive, do substrato.

Nantel e seus colaboradores (2002) demonstraram que células de *C. albicans* apresentavam morfologias diferentes após indução de crescimento planctônico sob diferentes condições. Essas células, quando crescidas em meio YPD a 30°C apresentavam morfologia leveduriforme e quando cultivadas com YPD com soro fetal bovino a 37°C exibiam morfologia filamentosa. Além disso, reportaram que o perfil transcricional eram diferentes nessas fases,

sendo que duplicou a expressão de 18 genes após a formação de hifas e outros 56 genes adicionais foram expressos, sendo que os genes *RBT1* e *HWP1*, em suas análises, estavam cinco vezes mais expressos nessa morfologia. Contudo outros 46 genes tiveram redução da expressão nas hifas quando comparada com as blastoconídeos, reforçando a hipótese de que a morfologia pode determinar padrões diferenciados de expressão gênica.

Seguindo essa mesma ideia de análise da expressão gênica sob diferentes condições, García-Sánchez et al (2004) compararam o perfil transcricional de *C. albicans* no modelo de crescimento planctônico e de biofilme. Reportaram que dos 1850 genes estudados, 325 estavam mais expressos na forma de crescimento de biofilme, sendo importantes para formação do mesmo. Samaranayake et al (2013) realizaram comparações de expressão gênica em *C. albicans* nos dois modelos de crescimento supracitados, e reportaram que as adesinas *ALS3* e *HWP1* estavam com níveis baixos de expressão no modelo planctônico, cuja morfologia é predominantemente leveduriforme, enquanto apresentavam níveis elevados de expressão no crescimento em biofilme, onde a forma de hifa é prevalente, reforçando-se que a forma de crescimento pode determinar o padrão de expressão.

Diante desses padrões de expressões, é sabidamente conhecido que determinados genes encontram-se mais ativos ou expressos em situações específicas, como foi demonstrado por Staab e colaboradores (1996). Demonstraram que a adesina *HWP1* somente era expressa na hifa do patógeno oportunista *C. albicans*, e possuem funções específicas, como demonstrado no estudo realizado por Nobile et al (2009), reportando que a adesina Hwp1p é essencial para filamentação e formação normal de biofilmes. Ainda, demonstraram que linhagens mutantes de *C. albicans* com deleção para a referida adesina, formavam biofilmes mais finos *in vitro*, com pouca presença de hifas, sendo o mesmo fenótipo observado em linhagens mutantes de *ALS3*.

Padovan e seus colaboradores (2009), ao estudarem o gene *HWP1* em três isolados de *C. albicans*, uma cepa de referência (SC5314) e dois isolados clínicos (L296 e L757), demonstraram que o presente gene se comportava de modo diferente entre as linhagens estudadas, e influenciava a formação de hifas, pois a linhagem que expressava o alelo menor (*HWP1-2*) apresentava comprometimento na formação de hifas, contribuindo diretamente para redução da formação de biofilme, quando comparado com as outras linhagens. Portanto, pode-se afirmar que existe relação diretamente proporcional entre formação de hifa e maior produção de biofilme, o que poderia ser correlacionado com o isolado de *T. asahii* L2585, que apresentou morfologia predominante de hifa e alto produtor de biofilme (ITURRIETA-GONZÁLES et al., 2014).

Além disso, ao analisarmos especificamente a expressão do gene *CFLI-like*, observou-se que nas linhagens L773 e CBS7631, cujos crescimentos predominantemente foi na forma de artroconídeos, houve aumento significativo em relação a linhagem que cresceu somente na forma de hifas. Segundo Wang et al (2012), o gene *CFLI* na levedura encapsulada *C. neoformans* induz a filamentação durante o processo sexuado de *mating* e está altamente expresso em hifas, conceito que pode explicar a expressão diferencial do gene nos isolados clínicos que possuem morfologias diferentes. Ainda, foi verificado que parte da CFL1p é clivada e secretada para matriz extracelular, tornando-se um importante sinalizador, pois a CFL1p exógena estimula a produção endógena de CFL1p por *C. neoformans*, que passam, então, a filamentar e formar biofilme (TIAN; LIN, 2013; WANG et al., 2012). Embora os artroconídeos de *T. asahii* derivem de hifas fragmentadas, pode-se especular que o processo de fragmentação sinalize ou seja sinalizado por CFL1p.

Finalmente, com a identificação de potenciais adesinas *in silico* e a verificação da presença de expressão gênica diferencial em células planctônicas, é possível afirmar que estamos no caminho de demonstrar de forma inédita e pioneira a detecção de novas adesinas no filo Basidiomycota, utilizando como modelo, o patógeno emergente *T. asahii*. Realizando ensaios futuros com células em diferentes condições de crescimento e diferentes morfologias poderemos demonstrar o verdadeiro papel das proteínas aqui identificadas como adesinas em *Trichosporon* spp..

7. CONCLUSÕES

1- Foi possível identificar por genômica comparativa genes hipotéticos codificadores de adesinas, sendo que o algoritmo de busca BLAST-NCBI retornou apenas uma sequência correspondente no genoma do *T. asahii*; Faapred foi pouco estrigente e com FungalRV foram obtidas predições mais acuradas.

2 - Através de critérios de seleção, foram identificados 4 genes codificadores de adesinas putativas por apresentarem peptídeo sinal, ausência de hélices transmembrana, e tamanho maior que 300 aminoácidos. Ainda, 3 deles são ricos em regiões repetitivas de serina e treonina passíveis de glicosilações e 1 deles, rico em resíduos de triptofano passíveis de manosições, sem predições de acetilação.

3 - Com a amplificação das ORFs completas dos genes e análise de expressão gênica de cepas de referência de *T. asahii* (CBS2479 e CBS7631) e 2 isolados clínicos (L773 e L2585), foi possível verificar que os genes putativos possuem RNA mensageiro sendo produzidos em crescimento planctônico, sendo possível propor a modificação do *status* nas anotações genômicas de “putativo” para “verificado”.

4 - Por meio da análise da expressão gênica, foi possível verificar que os genes *MAR-like*, *RESTINA-like* e *BETA-like* foram mais ativos na linhagem de referência CBS2479, proveniente de micose de pele, demonstrando que o sítio de isolamento pode influenciar na expressão desses genes em crescimento planctônico.

5 - Nas análises de expressão gênica dos isolados de hemocultura com diferentes padrões de produção de biofilme, não foi possível relacionar aumento de expressão com isolado altamente produtor de biofilme ou diminuição da expressão em isolado baixo produtor, para nenhum dos quatro genes de adesinas estudados.

6 - As análises de expressão revelaram que o gene *CFL1-like* foi mais expresso nas linhagens de hemocultura CBS7631 e L773 que apresentavam morfologia predominantemente de artroconídeos, ao invés daqueles que apresentavam morfologia filamentosa.

REFERÊNCIAS

ANDO, M., et al. Summer-Type Hypersensitivity Pneumonitis. **Internal Medicine**, United States, v. 34, n. 8, p. 707-712, 1995.

AOKI, W., et al. Profiling of adhesive properties of the agglutinin-like sequence (ALS) protein family, a virulent attribute of *Candida albicans*, **FEMS Immunology Medical Microbiology**, United Kingdom, v. 65, p. 121–124, 2012.

BAILEY, D. A., et al. The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. **Journal of Bacteriology**, United States, v.178, n. 18, p. 5353–5360, 1996.

BATES, S., et al. *Candida albicans* Iff11, a secreted protein required for cell wall structure and virulence. **Infection Immunity**, United States, v.75, n. 6, p. 2922–2928, 2007.

BENSON, P. M., LAPINS, N. A. and ODOM, R. B. White Piedra. **Archives of Dermatological**, Germany, v. 119, p. 602-604, 1983.

BENTUBO, H. D. L. and GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **Springer Plus**, Germany, v. 3, n. 377, p. 1-10, 2014.

BERGOLD, A. M. and GEORDIADIS. Novidade em fármacos antifúngicos: Uma revisão. **Visão Acadêmica**, Brazil, v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.

BHASKARAN, A., et al. *Trichosporon loubieri* Fungemia in a 39-Year-Old Caucasian Woman With B-Cell Lymphoblastic Leukemia. **Laboratory Medicine**, United States, v. 47, n. 3, p. 255–258, 2016.

BOISRAMÉ, A., et al. Unexpected role for a serine/threonine-rich domain in the *Candida albicans* Iff protein family. **Eukaryotic Cell**, United States, v. 10, n. 10, p. 1317–1330, 2011.

BONY, M. et al. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. **Journal of bacteriology**, United States, v. 179, n. 15, p. 4929–4936, 1997.

BROWN, J. L. & ROBERTS, W. K. Evidence that Approximately Eighty per Cent of the Soluble Proteins from Ehrlich Ascites Cells Are IV-Acetylated. **The Journal of biological Chemistry**, United States, v.25, n. 4, p. 1009-1014, 1975.

BYRON C. H & WALTER, P. The Signal Recognition Particle in *S. cerevisiae*. **Cell**, United States, v. 67, 131-144, 1991.

CAFARCHIA, C., et al. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. **Medical Mycology**, United Kingdom, v. 46, p. 429-434, 2008.

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

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. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v. 47, n. 4, p. 1074–1081, 2009.

CHAITANYA, V., et al. Disseminated *Trichosporon* infection in a renal transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, United States, v. 17, p. 605–609, 2015.

CHAUDHURI, R., et al. FungalRV: adhesin prediction and immunoinformatics portal for human fungal pathogens. **BMC Genomics**, United Kingdom, v. 12, n. 192, p. 1-14, 2011.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), **document M27-A3- Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast**, United States, 2008.

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

CORDEIRO, L. V. **Perfil epidemiológico de dermatofitoses superficial em pacientes atendidos em um laboratório da rede privada de João Pessoa-PB**. 2015, 53p, Monografia (Bacharel em Farmácia), Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2015.

DAG, A., and CERIKCIOGLU, N. Investigation of some virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from the clinical samples of hospitalized patients. **Mikrobiyoloji bülteni**. Turkey, v. 40, n. 3, p. 225-235, 2006.

- DI BONAVENTURA, G., et al. Biofilm Formation by the Emerging Fungal Pathogen *Trichosporon asahii*: Development, Architecture, and Antifungal Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 50, n. 10, p. 3269–3276, 2006.
- DRANGINIS, A. M., et al, A Biochemical Guide to Yeast Adhesins: Glycoproteins for Social and Antisocial Occasions. **Microbiology and molecular biology reviews**. United States, v. 71, n. 2, p. 282–294, 2007.
- DUARTE-OLIVEIRA, C., et al. The Cell Biology of the *Trichosporon*-Host Interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Switzerland, v. 7, n. 118, 2017.
- DUTTON, L. C., et al. Role of *Candida albicans* secreted aspartyl protease Sap9 in interkingdom biofilm formation. **Pathogens and Disease**, United Kingdom, v. 74, n. 3, p. 1–12, 2016.
- ENE, J. V. and BENNETT, R. J. Hwp1 and Related Adhesins Contribute to both Mating and Biofilm Formation in *Candida albicans*. **Eukariotic Cell**, United States, v. 8, n.12, p. 1909–1913, 2009.
- FERA, M. T., CAMERA, E. L. and SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. **Expert Reviews of Anti-infective therapy**, United Kingdom, v. 7, n. 8, p. 981-998, 2009.
- FERNANDES, C. L. **Caracterização conformacional de carboidratos e glicoproteínas: efeito da glicosilação na glicoproteína alfa1-ácida humana** 2008, 179p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Universidade do Rio Grande do Sul, 2008.
- FIGUEIREDO, D. S. Y., **Identificação fenotípica e molecular, perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e detecção de glucuronoxilomanana em isolados clínicos de *Trichosporon***. 2013. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- FONSECA, F. L., et al. Structural and functional properties of the *Trichosporon asahii* glucuronoxylomannan. **Fungal Genetic. Biology**, United States, v. 46, p. 496–505, 2009.
- FORTE, G. M. A., et al. N-Terminal Acetylation Inhibits Protein Targeting to the Endoplasmic Reticulum. **Plos Biology**, United States, v. 9, n. 5, 2011.
- FOSTER, C. E., et al. Trichosporonosis in Pediatric Patients With a Hematologic Disorder. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, United States, v.00, n. 00, p. 1–72017

- GARCÍA, M. A., GUTIÉRREZ-KOBEH, L. and VANCELL, R. L. *Entamoeba histolytica*: Adhesins and lectins in the trophozoite surface. **Molecules**, Switzerland, v. 20, p. 2802-2815, 2015.
- GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, United States, v. 13, n. 1, p. 122–143, 2000.
- GOOSSENS, K. V. Y. & WILLAERT, R. G. The N-terminal domain of the Flo11 protein from *Saccharomyces cerevisiae* is an adhesin without mannose-binding activity. **FEMS Yeast Research**, United Kingdom, v.12, p.78–87, 2012.
- GOTO, M. Protein O-Glycosylation in Fungi: Diverse Structures and Multiple Functions **Bioscienci, Biotechnology and Biochemistry.**, United Kingdom, v. 71, n. 6, p. 1415–1427, 2007.
- GRANGER, B. L. et al. Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. **Microbiology**. United Kingdom, v. 151, p. 1631–1644, 2005.
- GROOT, P.W.J. et al. Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. **Eukariotic cell**, United States, v. 12 n. 4, 2013.
- GUETHI, G. C. M. **Caracterização de blastoconídeos do gênero *Trichosporon* isoladas de três regiões costeiras do estado de São Paulo**. 2009. 192p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- GYAWALI, R., et al. A Family of Secretory Proteins Is Associated with Different Morphotypes in *Cryptococcus neoformans*. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 83, n. 5, p. 1-16, 2017.
- HALLEN-ADANS, H. E., et al. Fungi inhabiting the healthy human gastrointestinal tract: a diverse and dynamic. community. **Fungal ecology**, Netherlands, v. 15, p. 9-17, 2015.
- HAZIROLAN, G., et al. Head-to-Head Comparison of Inhibitory and Fungicidal Activities of Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, Posaconazole, and Isavuconazole against Clinical Isolates of *Trichosporon asahii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 57, n. 10, p. 4841–4847, 2013.

HESLOP, O. D., et al. Disseminated trichosporonosis in a burn patient: Meningitis and Cerebral Abscess Due to *Trichosporon asahii*. **Journal of clinical Microbiology**, United States, v. 49, n. 12, p. 4405–4408, 2011.

HOYER, L. L., & Hecht, J. E. The ALS6 and ALS7 genes of *Candida albicans*; **Yeast**, United States, v. 16: p. 847- 855, 2000.

HOYER, L. L., PAYNE, T. L. and HECHT, J. E. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and Localization of Als Proteins to the Fungal Cell Surface. **Journal of Bacteriology**, United States, v. 180, n. 20, p. 334–5343, 1998.

ICHIKAWA, T., et al. Phenotypic Switching and *N*-Acetylhexosaminidase Activity of the Pathogenic Yeast *Trichosporon asahii*. **Microbiology Immunology**, United States, v. 48. n.4, 237–242, 2004.

ICHIKAWA, T., et al. Switching of colony morphology and adhesion activity of *Trichosporon asahii* clinical isolates. **Medical Mycology**, United Kingdom, v. 54, n. 2, p. 189–196, 2016.

ITURRIETA-GONZALEZ, I. A., et al. Multiple Species of *Trichosporon* Produce Biofilms Highly Resistant to Triazoles and Amphotericin B. **Plos one**, United States, v. 9, n. 10, 2014.
Jain, N., Hasan, F. and Fries, B. C. Phenotypic Switching in Fungi current. **Fungal Infection Reports**, United States, v. 2, n. 3, p. 180–188, 2008.

JANZ, A. et al. Infectious Epstein-Barr Virus Lacking Major Glycoprotein BLLF1 (gp350/220) Demonstrates the Existence of Additional Viral Ligands. **Journal of Virology**. United States, v. 74, n. 21, p. 10142–10152, 2000.

JOHANSSON, M. E.V., et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **PNAS**. United States, v. 105, n. 39, 15064–15069, 2008.

KALAMAN, A. et al. Cutaneous trichosporosis **Mycopathologia**, Netherlands, v.101, p. 167-175, 1988.

KARASHIMA, R. et al. Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in *Trichosporon asahii* by repeated passage in mice. **Journal of Medical Microbiology**, United Kingdom, v. 51, p. 423–432, 2002.

KHAN, M. I. D., et al. *Trichosporon asahii* urinary tract infection in immunocompetent patients. **Medical Journal Armed Forces India**, India, v. 10, n. 3, p. 1-4, 2014.

KOKSAL, F.; ER, E.; SAMASTI, M. Causative Agents of Superficial Mycoses in Istanbul, Turkey: Retrospective Study. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 168, p. 117–123, 2009.

KUBIÇA, T. F. et al. Antifungal activities of tacrolimus in combination with antifungal agents against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Trichosporon asahii* isolates. **braz j infect dis.**, Brazil, v. 2, n. 6, p. 539–545, 2016.

LI, F., et al. Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. **Eukaryot. Cell**, United States, v. 6, p. 931–939, 2007.

LI, F. & Palecek, S. P. *EAPI*, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. **Eukaryot. Cell**, United States, v. 2, n. 6, p. 1266 –1273, 2003.

LIAO, Y. et al. *In Vitro* Activities of antifungal combinations against biofilms and planktonic forms of clinical *Trichosporon asahii* isolates. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, United States, v. 58, n. 12 p. 7615–7616, 2014.

LIAO, Y., et al. Epidemiology and Outcome of *Trichosporon* Fungemia: A Review of 185 Reported Cases. **Open Forum Infectious Diseases**, United States, v. 25, n. 2, 2015.

LIU, X. Z., et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 81, p. 85–147, 2015.

LUO, G., et al. Active and Passive Immunization with rHyr1p-N Protects Mice against Hematogenously Disseminated Candidiasis. **PLoS One**, United States, v. 6, n. 10, p. 1-8, 2011.

LUO, G., et al. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. **J. Infect. Dis.** United States, v. 201, n. 11, p. 1718 –1728, 2010.

MAGALHÃES, A. R., et al. *Trichosporon* isolation from human ungueal infections: is there a pathogenic role? **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brazil, v. 91, n. 2, p. 173-179, 2016.

MARINÉ, M., et al. On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by *Trichosporon* Species. **PLoS Pathogens**, United States, v.11, n. 7, p. 1-9, 2015.

MAXFIELD, L., et al. *Trichosporon* fungemia in a pediatric patient with acute lymphoblastic leukemia. **IDCases**, United Kingdom, v. 2, n. 4, p. 106–108, 2015.

MELVILLE, P. A., et al. Proteinase and phospholipase activities and development at different temperatures of yeasts isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Research**. United Kingdom, v. 78, p. 385–390, 2011.

MITTAL, A. and SINGH, S. Insights into eukaryotic evolution from transmembrane domain lengths. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, United Kingdom, v. 6, p. 1-7, 2017.

MITTAL, A. and SINGH, S. Transmembrane Domain Lengths Serve as Signatures of Organismal Complexity and Viral Transport Mechanisms. **Nature**, United Kingdom, v. 6, p. 1-17, 2016.

MOK, W. Y., LUIZÃO, R. C. C., and SILVA, M. S. B. Isolation of Fungi from Bats of the Amazon Basin. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 44, n. 3, p. 570-575, 1982.

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

MORALEZ, A. T. P., et al. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**. United States, v. 6, n. 7. p. 1-19, 2016.

NAILIS, H. et al. Real-time PCR expression profiling of gene encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and independent gene expression. **BMC Microbiology**, United Kingdom, v. 16, n. 10, 2010.

NANTEL, A., et al. Transcription Profiling of *Candida albicans* Cells Undergoing the Yeast-to-Hyphal Transition. **Molecular Biology of the Cell**, United States, v. 13, p. 3452–3465, 2002.

NILSSON, I. M. et al. The code for directing proteins for translocation across ER membrane: SRP cotranslationally recognizes specific features of a signal sequence. **Journal of Molecular Biology**. United States, v. 427, n. 600, p. 1191–1201, 2014.

NOBILE, C. J. et al. Complementary Adhesin Function in *C. albicans* Biofilm Formation. **Current Biology**, United States, v.18, n. 14, p. 1017–1024, 2008.

ODERO, V., et al. Fungemia por *Trichosporon asahii* en un paciente con neoplasia hematológica. **Revista Iberoamericana de Micología**, Spain, v. 32, n. 1, p. 59-61, 2014.

PADOVAN, A. C., CHAVES, G. M., COLOMBO, A. L., BRIONES, M. R. A novel allele of HWP1, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. **Medical Mycology**, United Kingdom, v. 47, p. 824–835, 2009.

PERES, N. T. A.; et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a Antifúngicos. **An Bras Dermatol.**, Brasil, v. 85, n. 5, p. 657-67, 2010.

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**. United States, v. 47, n. 1, p. 117–123, 2009.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. **Journal of clinical Microbiology**. United States, v. 45, n. 6, p. 1735–1745, 2007.

PRADHAN, S., et al. Prevalence of invasive Trichosporonosis by *Trichosporon asahii* and other *Trichosporon* species and their antifungal susceptibility pattern in Chhattisgarh. **International Journal of Medical Research and Review**, India, v. 5, n. 3, p. 285-292, 2017.

RAMANA, J, & GUPTA, D. FaaPred: A SVM-Based Prediction Method for Fungal Adhesins and Adhesin-Like Proteins. **PLOS ONE**. United States, v. 5, n. 3, 2010.

REDDY, B. T., TORRES, H. A. and KONTOYIANNIS, D. P. Breast Implant Infection Caused by *Trichosporon beigeli*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, United Kingdom, v. 34, n. 2, p. 143-144, 2009.

RIKEN, BRC-JCM **Genome sequencing of *Trichosporon coremiiforme*** JCM 2938, 24 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJDB3697>>. Acesso em: 23 jun. 2016

RIKEN, BRC-JCM **Genome sequencing of *Trichosporon faecale*** JCM 2941, 24 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJDB3698>>. Acesso em: 23 jun. 2016

RIKEN, BRC-JCM **Genome sequencing of *Trichosporon inkin*** JCM 9195, 24 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJDB3701>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

RIKEN, BRC-JCM **Genome sequencing of *Trichosporon ovoides*** JCM 9940, 24 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJDB3702>>. Acesso em 23 jun. 2016.

RIZZITELLI, G., et al. Onychomycosis caused by *Trichosporon mucoides*. **International Journal of Infectious Diseases**, Netherlands, v. 42, p. 61–63, 2016.

RODRIGUES, M. L., et al. The still obscure attributes of cryptococcal glucuronoxylomannan. **Medical Mycology**, United Kingdom, v.47, n. 8, p. 783–788, 2009.

ROMAN, A. D. E. et al. Invasive trichosporonosis in an AIDS patient: case report and review of the literature. **International Journal of STD & AIDS**, United Kingdom, v. 25, n. 1, p. 70–75, 2014.

ROSHAN, A. S.; JANAKI, C.; Parveen, B. White *Piedra* in a Mother and Daughter. **International Journal of Trichology**. India, v.1, n. 2, p. 140-141, 2009.

RUBIC, Z., et al. Prompt Diagnosis and Effective Treatment of *Trichosporon asahii* Catheter-Related Infection in Non-immunocompromised Neurosurgical Patient. **Mycopathologia – Springer**, Netherlands, v. 179, p. 125–128, 2015.

SAMARANAYAKE, Y. H., et al. Human Serum Promotes *Candida albicans* Biofilm Growth and Virulence Gene Expression on Silicone Biomaterial. **PLOS ONE**, United States, v. 8, n. 5, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning** – a laboratory manual. 2. ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1886 p.

SAMULOWITZ, U. et al. Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules and decoration with the MECA-79 epitope. **American Journal of Pathology**. United States, v. 160, n. 5, p. 1669-1681, 2002.

SARDI, J. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Iberoamericana de Micologia**, Spain, v. 31, n. 1, p. 22-29. 2014.

SATER, A. **Tocando em frente**. Álbum luminárias, ao vivo, Columbia Records, Brazil, 1992.

SCHILD, L. et al. Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. **Eukaryotic Cell**. United States v. 10, n°1, p.98 –109. 2011.

SCHULZE, I., et al. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts – *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. **AMB Express Springer open journal**, Germany, v. 4, n. 24, p. 1-11, 2014.

SHEPPARD, D. C. et al. Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans* **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 279, n. 29, p. 30480–30489, 2004.

SHEPPARD, D. C. Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. **Current Opinion in Microbiology**. Netherlands, v. 14, p. 375–379, 2011.

SIDAROUS, M. G., REILLY, M. V. O. and CHERUBIN, C. E. A Case of *Trichosporon beigeli* Endocarditis 8 Years after Aortic Valve Replacement. **Clinical. Cardiology**, United States, v. 17, n. 2, 215-219, 1994.

SILVA-BEDOYA, L. M., CASTRILLÓN, M. R. and CADAVID, E. O. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 45, n. 1, p. 135-142, 2014.

SIM, J. H. C. et al. Characterization of *Trichosporon* spp. Isolates from Blood Stream and Central Nervous System Infections in a Tertiary Hospital in Singapore. **Open Forum Infectious Diseases**, United States, v. 3, n. 1, 2016.

SOUZA, E. A. F.; et al. Frequência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Parana, Brasil. **An Bras Dermatol**, Brasil, v. 82, n. 2, p. 151-156, 2007.

STAAB, J. F. et al. Developmental Expression of a Tandemly Repeated, Proline- and Glutamine-rich Amino Acid Motif on Hyphal Surfaces of *Candida albicans*. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 271, n. 11, p. 6298–6305, 1996.

SUGITA, T., et al. Isolation of *Trichosporon asahii* from environmental materials. **Medical Mycology**, United Kingdom, v. 38, p. 27–30, 2000.

SUGITA, T., IKEDA, R. and SISHIKA, A. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. **Journal of clinical Microbiology**. v. 42, n. 12, p. 5467–5471, 2004.

SUN, W., et al. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. **Journal of Medical Microbiology**, United States, v. 61, p. 1750–1757, 2012.

TAMBE, S. A. et al. Two cases of scalp white piedra caused by *Trichosporon ovoides*. **Indian Journal Dermatology**, Indian, v. 75, n. 3, p. 293-295, 2009.

TENDOLKAR, U. et al. *Trichosporon inkin* and *Trichosporon mucoides* as unusual causes of white piedra of scalp hair. **Indian Journal of Dermatology**, Indian, v. 80, n. 4, p. 324-327, 2014.

TIAN, X. & LIN, X. Matricellular protein Cfl1 regulates cell differentiation **Communicative & Integrative Biology**, United States, v.6, 2013.

URAI, M., et al. Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent *Cryptococcus gattii* by Altering Capsule Glucuronoxylomannan Structure. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Switzerland, v. 5, n. 101, 2016.

VASCONCELLOS, C., et al. Identification of fungi species in the onychomycosis of institutionalized elderly. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Brazil, v. 88, n. 3, p. 377-380, 2013.

VERSTREPEN, K. J., REYNOLDS, T. B. FINK, G. R. Origins of variation in the fungal cell surface. **Nature reviews- Microbiology**, United Kingdom, v. 2, p. 533-540, 2004.

VERSTREPEN, K. J., KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, United Kingdom, v. 60, n. 1, p. 5-15, 2006.

VERSTREPEN, K. J & FINK, G. R. Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi. **Annual Review of Genetics**, United States, v. 43, p. 1-24, 2009.

VIJAY, A.; GUPTA, S.; RAWAT, S.; JAIN, S. K. A rare case of coinfection with white piedra and pediculosis capitis. **Indian Dermatology Online Journal**, Indian, v. 8, n. 4, p. 279-280, 2017.

VILA, T. V. M. and Rozental, S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. **Fungal Pathogenicity**. p. 1-23, 2016.

WALLING, D. M., et al. Disseminated Infection with *Trichosporon beigeli*. **Reviews of Infectious Diseases**, United States, v. 9, n. 5, p. 1013-1019, 1987.

WALSH, T. J., et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology Infection**, United Kingdom, v.10, p. 44–66, 2004.

WANG, L. ZHAI, B, LIN, X. The Link between Morphotype Transition and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Plos Pathogens**, United States, v. 8, n. 6, p. 1-13, 2012.

WATSON, K. C. & KALLICHURUM, S. Brain Abscess Due To *Trichosporon Cutaneum*. **Journal of Medical Microbiology**, United Kingdom, v.3, p.191-1931, 1970.

WHITIMAN, R., et al. Microbes in Beach Sands: Integrating Environment, Ecology and Public Health. **National Institutes of Health**. United States, v.13 n. 3, p. 329–368, 2014.

YANG, R., et al. Disseminated trichosporonosis in China. **Mycoses**, United Kingdom, v. 46, n. 11-12, p. 519-523, 2003.

YANG, M., GAO, H. and LI, L. A fatal case of *Trichosporon asahii* fungemia and pneumonia in a kidney transplant recipient during caspofungin treatment. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, New Zealand, v. 10, p. 759–762, 2014.

YANG, S. et al. In Vitro Interactions between Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Antifungal Agents against Planktonic and Biofilm Forms of *Trichosporon asahii*. **Plos One**, United States, v. 11 n. 6, p. 1-12, 2016.

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

ZHAO, et al. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als Family. **Microbiology**, United Kingdom, v. 151, p. 1619–1630, 2005.

ZHAO, X. et al. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, United Kingdom, v. 150, p. 2415–2428, 2004.

ZHU, L. B. et al. Influence of environmental and nutritional conditions on yeast–mycelial dimorphic transition in *Trichosporon cutaneum*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, United Kingdom, v. 31, n. 3, p. 516–526, 2017.

ZUO, Q., et al. *Trichosporon asahii* infection after total knee arthroplasty: A case report and review of the literature. **Canadian Journal Infectious Diseases Medical Microbiology**, Canada, v. 26, n. 1, p. 47-51, 2015.