



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

BRUNO NASCIMENTO DA SILVA

**EFEITO DA VANCOMICINA SOBRE O CRESCIMENTO E A VIRULÊNCIA
DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Trichosporon spp***

FORTALEZA

2020

BRUNO NASCIMENTO DA SILVA

**EFEITO DA VANCOMICINA SOBRE O CRESCIMENTO E A VIRULÊNCIA
DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Trichosporon spp***

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

Orientadora: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

FORTALEZA

2020

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

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

- S578e Silva, Bruno Nascimento da.
Efeito da vancomicina sobre o crescimento e a virulência de células planctônicas e biofilmes de *Trichosporon* spp / Bruno Nascimento da Silva. – 2023.
86 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.
1. Antibiótico. 2. Infecções Fúngicas Invasivas. 3. Tricosporonose. 4. *Caenorhabditis elegans*. 5. persistentes. I. Título.

CDD 616.9

BRUNO NASCIMENTO DA SILVA

**EFEITO DA VANCOMICINA SOBRE O CRESCIMENTO E A
VIRULÊNCIA DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE
*Trichosporon spp***

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves

Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Dra. Erika Freitas Mota

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus por nunca me desamparar e sempre
ser minha fortaleza durante as tribulações

Aos meus pais, avós e tias.

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos vendo inúmeros pós-graduandos defenderem suas dissertações e teses sempre me indaguei qual a parte mais difícil e qual a que fica por último. Pensei que fosse conferir as referências ou regular o sumário, mas nunca passou pelo meu pensamento que a última parte da minha dissertação seriam os agradecimentos. Confesso, posterguei bastante essa escrita, talvez seja mais difícil que realizar os experimentos, computar os resultados ou até mesmo escrever a revisão de literatura. Talvez eu sinta isso pois como bem diz a professora Rossana: “Você é um menino muito grato” ou por eu ser muito emotivo.

Agradeço primeiramente a Deus, por inúmeros fatos e motivos, acredito que tudo em minha vida tenha sua influência e só ele sabe o quanto eu almejava esse título e o quanto eu lutei para chegar até aqui. Obrigado Senhor por sempre me guiar pelos melhores caminhos, estar comigo 24 h por dia e NUNCA me desamparar, sempre dando o seu “jeitinho” para tudo na minha vida se encaixar e mesmo sem que eu mereça NADA, tu providencias TUDO.

Agradeço a mim mesmo, como diria o ditado “ai de mim se não fosse eu”. Eu me agradeço pela minha força, determinação, garra e capacidade de resiliência. Obrigado Bruno, pois mesmo com as inúmeras dificuldades você nunca desistiu de nada, você sempre foi otimista e acreditava que as coisas sempre iriam dar certo, nunca soube como iria dar certo, só acreditava nisso e seguia em frente. Só Deus e eu sabemos quantas guerras tive que travar para chegar até aqui. Mesmo com todos os meus defeitos, eu admiro a pessoa que tornei, Obrigado Bruno!

(O agradecimento mais difícil). À minha mãe, Marineuda Lima do Nascimento. Mãe você é tudo para mim. Quem me conhece sabe que eu não consigo falar de ti sem chorar. Mãe, obrigado por TUDO. Sem ti eu não seria NADA, nadinha. Obrigado por desde a infância me influenciar em meus estudos, mesmo com as poucas condições financeiras a senhora sempre fez de tudo para que eu tivesse uma boa educação. Obrigado por sempre acreditar em mim e me apoiar em tudo que eu me pensava em fazer, até quando eu mesmo desacreditei de mim a senhora acreditava, cada palavra de apoio sua foi fundamental para mim. Eu te amo além do Universo.

Obrigado pai, pois do seu jeito (rsrs), o senhor sempre me ajudou como pôde. Obrigado por sempre me influenciar a ser uma pessoa melhor, torcer e acreditar em mim e mesmo o senhor até hoje não sabendo o que eu faço na minha profissão, se orgulha do mesmo jeito. Apesar de tudo você é meu pai e eu te amo, fico muito feliz em estarmos mais próximos ultimamente e que continuemos assim.

As minhas irmãs, Brena, Cecília e Vitória. Brena por me aturar e sempre ser compreensiva nos meus momentos de estresse e por todo o apoio. Às minhas duas princesas menores, eu agradeço por cada abraço e beijo gostoso que renovavam minhas forças, vocês são meu combustível e força para prosseguir. Amo vocês.

Aos meus avós, Eliane Maria, Evaldo Raulino, Maria do Carmo e Geraldo Lima. Vocês são as coisas mais preciosas que tenho na minha vida. Eu amo vocês de uma forma que não posso mensurar. Obrigado por todo o apoio e por sempre se orgulharem de mim.

A todos os meus familiares, tias, tios, primos e primas, pelo apoio.

Ao meu amigo, Micael Martins por abrir as portas da sua casa quando eu não tinha onde ficar pelos 8 primeiros meses desta etapa. Obrigado por tudo, palavras não são suficientes para agradecer pelo o que você fez por mim.

Aos meus amigos mais próximos de Capistrano, Lara Nogueira, Karyne Barros, Stephany Matos, Ruana Raulino e Elienai Ribeiro por todo o apoio. Cada palavra e ajuda

de vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Como também a meus amigos que fiz durante minha graduação, levo cada um no coração.

A TODOS os meus outros amigos (a quem eu realmente posso chamar de amigos, esses sabem quem são), por cada palavra de apoio e motivação. Todos vocês são especiais.

A meus ex-professores, Mariana Vidal, Lilian Vandesmet, Cicero Ramon, Emerson de Oliveira, Waleska Freitas e Cássia Saldanha, por todo o incentivo e formação profissional, me inspiro em vocês.

Agradeço a minha orientadora (a quem faz jus essa nomeação), Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, por exatamente tudo. Cada puxão de orelha e palavra de motivação. Obrigado professora por acreditar em mim e confiar no meu trabalho, por sempre me tranquilizar e me fazer acreditar que tudo iria dar certo (mesmo que não desse). Desculpe-me pelas vezes em que trouxe algum problema para a senhora resolver, já sendo tão atarefada. Na senhora eu vejo uma coisa que percebo em poucas pessoas, um olhar humano. O modo como a senhora trata seus alunos sem fazer acepção e como se importa com a gente é uma coisa ímpar. Saiba, que cada vez que a senhora perguntou como eu e minha família estávamos foi muito importante, em muitas ocasiões era a única coisa que eu estava precisando ouvir. És um exemplo de pessoa e profissional. Ao decorrer da minha trajetória profissional e acadêmica almejo ser pelo menos 10% da pessoa que a senhora é, ou pelo menos aprender algumas dessas palavras difíceis que a senhora usa rrsrrsrs.

Agradeço especialmente também a Professora Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, a qual eu tenho grande admiração também como pessoa e profissional, obrigado por toda a ajuda e por sempre me deixar utilizar a centrífuga de tubos e o espectrofotômetro rrsrrsrs.

A Professora Sâmia Brilhante e aos professores Marcos Fábio e Júlio Sidrim, por toda a preocupação com o laboratório no qual nos necessitamos para executar nossas atividades e por serem multiplicadores de conhecimento em suas disciplinas contribuindo para a formação de cada aluno. Como também, a todos os outros professores que tive a oportunidade de cursar suas disciplinas e usufruir do conhecimento transmitido.

A CAPS, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro que torna possível a realização de nossos projetos, como também ao Centro Especializado em Micologia Médica e a Universidade Federal do Ceará, juntamente ao restaurante universitário (RU) e a Central Analítica, por todo o suporte.

À Ana Luiza Ribeiro Aguiar. Palavras não seriam suficientes para agradecer por toda paciência e dedicação para com a minha pessoa. Você foi realmente uma mãe, pegava em minhas mãos e me ensinou grande parte das atividades do laboratório e dos meus experimentos, eles teriam sido bem mais difíceis sem sua ajuda. Durante esses dois anos foi meu braço direito e meu divertimento semanal. Em você achei uma amiga e parceira, te amo tia aninha.

Ao meu amigo e pai Vandbergue Santos... pelas INÚMERAS vezes que eu precisei e você sempre me ajudou, olha que não foram poucas. Obrigado por abrir as portas da sua casa para que eu não perdesse o horário do fluxo, principalmente nas quartas feiras. Nossa amizade vai além do espaço do CEMM, eu ganhei um amigo para a vida toda. Você é uma pessoa iluminada e tem o coração tão grande que nem sei como cabe na tua caixa torácica. Espero um dia conseguir retribuir tudo que fizestes por mim.

Anderson da Cunha Costa meu infinito agradecimento. Em você encontrei um colega de trabalho, amigo e irmão, realmente um irmão. Você é a pessoa que escuta todas as minhas angústias e reclamações, sempre esteve comigo durante todos os momentos nesses dois anos, nos momentos bons e ruins. Você é o tipo de pessoa que alegra a minha

vida e te levarei para sempre comigo no coração. Com você eu sei que posso contar SEMPRE.

Aos meus amigos Expedito Maia, Nicole Fiallos Matheus de Souza e Mirele Fernandes que juntamente com Anderson, Vandbergue e Ana Luiza tornaram essa caminhada mesmo exaustiva, sempre compartilhando sofrimentos e alegrias, vocês foram essenciais.

Aos meus amigos da turma 2018.2: Anderson Costa, Expedito Maia, Carliane Melgarejo, Matheus de Souza, Débora Damásio, Helaine Almeida e Aryadine Venâncio, por serem pessoas tão especiais que tornaram as disciplinas obrigatórias do programa menos tortuosas. São pessoas que levarei para toda a vida.

Meus agradecimentos exclusivos a Fernando Monteiro, Livia Galdino e Raquel Colares. Por sempre seres humanos tão especiais e sempre me ajudarem quando precisei, vocês são meu trio favorito do laboratório, amigos que encontrei nessa caminhada para somar na minha vida.

Agradeço as melhores I.Cs que qualquer Pós-Graduandos poderia ter. Gyrliane de Santos Sales e Mariana Lara Mendes Pergentino, por toda a ajuda em cada etapa experimental, seja embalando material, fazendo repique ou entrando no fluxo juntamente comigo, vocês foram essenciais meninas, as quais também posso chamar de amigas.

A Terezinha de Jesus, minha mãezona carinhosamente, Tetê. Você é a luz daquele laboratório, nos diverte, dá conselho e sempre dá um jeitinho quando pedimos o material fora do prazo rrsrrsrs. Obrigado por me tratar tão bem e me acolher como seu filho.

A anteriormente técnica e agora professora, Gláucia Morgana de Melo Guedes por sempre somar com nossos conhecimentos, por cada conversa e por sempre pesar minhas drogas rrsrrsrs.

A Doutorada Silviane Praciano por ser também essa pessoa maravilhosa que compõe o CEMM e sempre está disposta a ajudar todos.

A todos meus outros colegas que fiz no CEMM, Géssica Araújo, Gerlane Luziana, Xhaulla Foncesa, Wilker Gotay, Ane Teles, Santiago Bezerra, Renan Vasconcelos, Gleice Rocha, Lana Glerieide, Lara, Raissa Geovana, Juliana Maciel, Jonathas Sales, Feynman Dias, Jaiane Alves e Rodrigo Campos. Obrigado a todos pelas conversas e partilha de conhecimentos, que sejamos profissionais de destaque na sociedade, a vocês todos desejo todo o sucesso do mundo.

A minha banca de qualificação professora Jakelyne Marques e Antônio José (Tony) pela disponibilidade e riquíssimas contribuições. Tony também responsável por me apresentar o Curso de Férias em Microbiologia que foi minha primeira porta de entrada ao PPGMM. Aos professores Guilherme Chaves e Érika Mota pelas valiosas contribuições na etapa final da defesa.

A Carolinda, nossa querida e amada secretária, que infelizmente não fará mais parte da secretaria do PPGMM. Carolzinha, você é um anjo, obrigado por TUDO.

Por fim e de forma mais generalizada, agradeço a todos que tive o prazer de conhecer durante essa jornada. Foi difícil, repleta de altos e baixos, mas conseguir vencê-la.

OBRIGADO GALERA!

“Você não sabe o quanto eu caminhei
Pra chegar até aqui
Percorri milhas e milhas antes de dormir
Eu nem cochilei
Os mais belos montes escalei
Nas noites escuras de frio chorei.”
- Cidade Negra

RESUMO

Espécies do gênero *Trichosporon* têm sido reconhecidas como agentes de infecções fúngicas invasivas em indivíduos vulneráveis, tais como pacientes neutropênicos com malignidades hematológicas, portadores do vírus HIV/Aids, além dos pacientes em tratamento com quimioterápicos, corticoides, antifúngicos e antibacterianos. Uma vez que antibioticoterapia é um importante fator de risco para o surgimento de IFIs, este trabalho teve por objetivo analisar o efeito da vancomicina (VAN) frente a cepas clínicas de *Trichosporon* spp. Foi investigado o efeito do antibiótico sobre o crescimento planctônico e a formação de biofilmes de *T. inkin* (n=6) e *T. asahii* (n=6). O antibiótico foi testado nas concentrações equivalentes ao pico plasmático (PP; 30µg/ml) e metade do pico plasmático (PP/2; 15 µg/ml). A cinética de crescimento planctônico foi avaliada por meio da análise metabólica de células viáveis; os biofilmes foram formados em microplacas de poliestireno e analisados quanto à viabilidade e biomassa em quatro estágios: durante a adesão (0h), após 6 h de adesão celular, desenvolvimento após 24 h de incubação e após maturação do biofilme (48 h). Verificou-se também o efeito de VAN sobre a quantificação de células persistentes (*persistenter cells*) no interior do biofilme, bem como a suscetibilidade dessas células à anfotericina B. O efeito de VAN na virulência de *Trichosporon* spp. foi avaliado pelo modelo de infecção experimental com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Por fim, a morfologia e ultraestrutura dos biofilmes foram avaliadas por Microscópio Eletrônico de Varredura e Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Observou-se que VAN (PP) foi capaz de estimular a atividade metabólica em 8/12 cepas crescidas na forma planctônica e também estimulou a atividade metabólica e biomassa dos biofilmes em todos os tempos de desenvolvimento. O antibiótico (PP) aumentou a quantidade de células persistentes em 8/12 cepas de *Trichosporon* spp. As células persistentes dos biofilmes formados com VAN apresentaram maior tolerância à anfotericina B, quando comparadas às células persistentes obtidas de biofilmes livres de VAN. Os testes com *C. elegans* mostraram que VAN foi capaz de aumentar a virulência de *Trichosporon* spp., ocasionando a mortalidade do nematódeo após o 2º dia de infecção. Análise ultraestrutural evidenciou maior celularidade, biomassa e maior tolerância a anfotericina B nos biofilmes cultivados com VAN, em comparação com os biofilmes controles. Este estudo mostrou que a VAN pode estimular o crescimento de células planctônicas e biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii* e aumenta a virulência fúngica in vivo.

Palavras-chave: Antibiótico. Infecções Fúngicas Invasivas. Tricosporonose. *Caenorhabditis elegans*. persistentes.

ABSTRACT

Species of the genus *Trichosporon* have been recognized as agents of invasive fungal infections in vulnerable individuals, such as neutropenic patients with hematological malignancies, carriers of the HIV / AIDS virus, in addition to patients undergoing treatment with chemotherapy, corticosteroids, antifungals and antibacterials. Since antibiotic therapy is an important risk factor for the appearance of IFIs, this study aimed to analyze the effect of vancomycin (VAN) against clinical strains of *Trichosporon* spp. The effect of the antibiotic on planktonic growth and biofilm formation of *T. inkin* (n = 6) and *T. asahii* (n = 6) was investigated. The antibiotic was tested at concentrations equivalent to the plasma peak (PP; 30 µg / ml) and half of the plasma peak (PP / 2; 15 µg / ml). Planktonic growth kinetics was assessed by means of metabolic analysis of viable cells; biofilms were formed in polystyrene microplates and analyzed for viability and biomass in four stages: during adhesion (0h), after 6 h of cell adhesion, development after 24 h of incubation and after biofilm maturation (48 h). The effect of VAN on the quantification of persistent cells within the biofilm was also verified, as well as the susceptibility of these cells to amphotericin B. The effect of VAN on the virulence of *Trichosporon* spp. was evaluated by the experimental infection model with the nematode *Caenorhabditis elegans*. Finally, the morphology and ultrastructure of biofilms were evaluated by Scanning Electron Microscope and Confocal Laser Scanning Microscopy. It was observed that VAN (PP) was able to stimulate metabolic activity in 8/12 strains grown in planktonic form and also stimulated the metabolic activity and biomass of biofilms at all times of development. The antibiotic (PP) increased the amount of persistent cells in 8/12 strains of *Trichosporon* spp. The persistent cells of biofilms formed with VAN showed greater tolerance to amphotericin B, when compared to persistent cells obtained from biofilms free from VAN. Tests with *C. elegans* showed that VAN was able to increase the virulence of *Trichosporon* spp., Causing nematode mortality after the 2nd day of infection. Ultrastructural analysis showed greater cellularity, biomass and greater tolerance to amphotericin B in biofilms cultivated with VAN, in comparison with control biofilms. This study showed that VAN stimulates the growth of planktonic cells and biofilms of *T. inkin* and *T. asahii* and increases fungal virulence in vivo.

Keywords: Antibiotic. Invasive Fungal Infections. Trichosporonose. *Caenorhabditis elegans*. Persistent.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estruturas microscópicas de *Trichosporon* spp. (A) *T. ovoides*: hifas septadas, 21
artroconídios, apressórios; (B) *T. inkin*: hifas septadas, apressórios e sarcinas;
(C) *T. cutaneum*: hifas septadas, blastoconídios clavados; (D) *T. asteroides*:
hifas septadas e crescimento meristemático; (E) *T. asahii*: hifas septadas e
artroconídios; (F) *T. mucoides*: hifas septadas e blastoconídios
clavados.....
- Figura 2** – Atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme. Atividade 25
metabólica em um aglomerado de células de biofilme é uma função da
profundidade dentro do biofilme e é influenciada pelo transporte de
nutrientes. Células nas bordas de uma microcolônia na interface do líquido a
granel são os mais ativos. Células dentro da microcolônia pode permanecer
dormente e fornecer um núcleo para regeneração após tratamento com
antibióticos.....
- Figura 3** - Variação e distribuição geográfica de espécies de *Candida*. Os dados 30
apresentados são da Austrália, Brasil, Canadá, Dinamarca, França, Japão e
Estados Unidos. Os dados sobre *C. auris* são dos Centros de Controle e
Prevenção de Doenças Dentre as espécies de *Candida*, *C. albicans* é a espécie
mais prevalente associada à candidíase invasiva. Um número crescente de
países relatou casos de infecção por *Candida*
auris.....
- Figura 4** - Macro e micromorfologia de *Trichosporon* spp. (A) blastoconídios; (B) e (C) 34
artroconídios (D) hifas verdadeiras; (E) pseudo-hifas; (F) presença de
apressório; (G) teste de urease; (H) e (I) morfologia das colônias de
Trichosporon
spp.....
- Figura 5** - Efeitos de antibióticos em toda a comunidade microbiana na microbiota 38
intestinal humana. O tratamento com antibióticos altera a estrutura
populacional do microbiota indígena, reduzindo a diversidade bacteriana e
redistribuindo a composição dos membros em efeitos transitórios e
persistentes. Os antibióticos também selecionam membros da comunidade
resistentes a antibióticos, enriquecendo a presença de genes de resistência no
microbioma. O tratamento com antibióticos promove a transferência de
informações genéticas entre as bactérias, aumentando a conjugação, a
transdução de fago e a mobilidade do plasmídeo, principalmente por meio da
ativação de respostas de estresse celular.....
- Figura 6** - Representação estrutural do antibiótico glicopeptídico vancomicina, 40
destacando os sete aminoácidos AA-1,..., AA-7 e os cinco anéis aromáticos
A, B, C, D, E
presentes.....
- Figura 7** - Organograma representativo das etapas metodológicas deste estudo..... 47

Figura 8 - . Esquemática dos experimentos com biofilmes de *Trichosporon* spp. 51

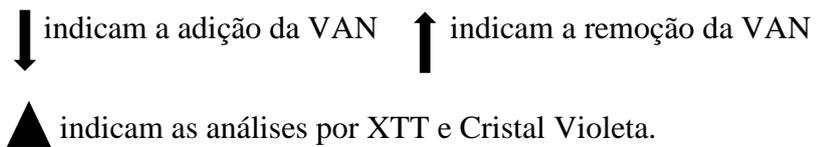


Figura 9 - Efeito de VAN em células planctônicas de *T. asahii* (n = 6) e *T. inkin* (n = 6). As cepas foram cultivadas em meio RPMI suplementado com VAN em concentrações que correspondem ao pico plasmático da droga (PP) ou meio pico plasmático (PP / 2). A atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio de redução XTT. Os valores são apresentados como média ± DP. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle livre de drogas (P <0,05)

.....

Figura 10 Efeito da vancomicina (VAN) na virulência *in vivo* de *T. inkin* CEMM 05-6-074 (**10A**) e *T. asahii* CEMM 05-6-072 (**10B**) no modelo de infecção por *C. elegans*. Os vermes foram autorizados a se alimentar por 2 h em *Trichosporon* spp. crescido com ou sem VAN na concentração de PP e, em seguida, transferido para meio líquido livre de patógenos na presença de VAN ou solução salina (controle). Os vermes mortos foram contados e removidos diariamente. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos de cada espécie (p <0,05)

.....

Figura 11 Efeito da VAN sobre a atividade metabólica (**A, B, C e D**) e biomassa (**E, F, G e H**) de biofilmes de *T. inkin* no tempo zero (**A, E**), adicionado após 6h de adesão (**B, F**), após 24h de desenvolvimento (**E, G**) e após a maturação de 48h (**D, H**).

.....

Figura 12 Efeito da VAN sobre a atividade metabólica (**A, B, C e D**) e biomassa (**E, F, G e H**) de biofilmes de *T. asahii* no tempo zero (A, E), adicionado após 6h de adesão (B, F), após 24h de desenvolvimento (**E, G**) e após a maturação de 48h (**D, H**).....

Figura 13 Efeito de VAN no número de células persistentes em biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii*. Os biofilmes foram formados em meio RPMI suplementado com VAN em concentração equivalente ao seu pico plasmático; Biofilmes maduros com 48 h foram então tratados com 100 µg / mL AMB (VAN-AMB). Biofilme controles foram formados em meio RPMI e após a maturação foram tratados com 100 µg / mL AMB. Os valores são apresentados como média ± DP. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle livre de drogas (P <0,05)

.....

Figura 14 Ação da VAN frente a biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii*. Imagens ilustram biofilmes controle maduros cultivados sem VAN (**A e B**), biofilmes maduros

cultivados com VAN (**C e D**), biofilmes maduros cultivados sem VAN e tratados com 100 µg/mL de AMB (**E e F**), e biofilmes maduros cultivados com VAN e tratados com 100 µg/mL de AMB (**G e H**). Aumento 5.000x.....

Figura 15 Ação da VAN frente ao biofilme de *T. inkin*. Imagens ilustram biofilme 67 controle maduro cultivado sem VAN (**A**), biofilme maduro cultivado com VAN (**B**), biofilme maduro cultivado sem VAN e tratados com 100 µg/mL de AMB (**C**), e biofilme maduro cultivado com VAN e tratado com 100 µg/mL de AMB (**D**).....

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Identificação e origem de isolamento das cepas de *Trichosporon* utilizadas 45 neste estudo.....
- Tabela 2** – Concentração inibitória mínima (CIM) da anfotericina B (AMB) contra as 63 cepas de *T. inkin* e *T. asahii* em diferentes condições de cultivo.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
GXM	Glucuronoxilomanana
IF	Infecção fúngica
IFI	Infecções Fúngicas Invasivas
IGS	<i>Intergenic Spaces</i>
ITS	<i>Internal Transcriber Spaces</i>
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
NGM	<i>Nematode Growth Medium</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PP	Pico plasmático
PP/2	Pico plasmático/2
rDNA	DNA ribossomal
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
VAN	Vancomicina
XTT	sal tretazólico 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5- sulfofenil)-5 [(fenilamino)carbonil]-2H- hidróxido de tetrazólio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	<i>Trichosporon</i> spp: Aspectos históricos.....	21
2.2	Fungos do gênero <i>Trichosporon</i>	22
2.2.1	<i>Generalidades</i>	22
2.2.2	<i>Fatores de virulência</i>	24
2.2.3	<i>Biofilmes</i>	26
2.2.4	<i>Infeções ocasionadas por Trichosporon spp</i>	28
2.3	Infeções fúngicas invasivas.....	29
2.3.1	<i>Epidemiologia das infecções fúngicas invasivas</i>	31
2.4	Diagnóstico Laboratorial.....	34
2.5	Tratamento.....	37
2.6	Influência dos antibióticos sobre a microbiota.....	39
2.7	Vancomicina.....	42
3	HIPÓTESES.....	44
4	OBJETIVOS.....	45
4.1	Objetivo Geral.....	45
4.2	Objetivos Específicos.....	45
5	METODOLOGIA.....	46
5.1	Local do Estudo.....	46
5.2	Microrganismos.....	46
5.3	Drogas utilizadas.....	47
5.4	Sensibilidade de células planctônicas.....	50
5.5	Ensaio com <i>Caenorhabditis elegans</i>	51
5.6	Formação dos biofilmes.....	52
5.7	Formação dos biofilmes em diferentes tempos de adição da vancomicina.....	53
5.7.1	<i>Efeito da VAN sobre a adesão celular</i>	54
5.7.2	<i>Efeito da VAN sobre o desenvolvimento do biofilme (6 h)</i>	54
5.7.3	<i>Efeito da VAN sobre o desenvolvimento do biofilme (24 h)</i>	54
5.7.4	<i>Efeito da VAN sobre o biofilme maduro (48 h)</i>	55
5.8	Plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)	55
5.9	Sensibilidade das células persistentes.....	56
5.10	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	56

5.11	Microscopia Confocal de Varredura a Laser – MCVL.....	57
5.12	Análise estatística.....	58
6	RESULTADOS.....	59
6.1	VAN estimula a atividade metabólica das células planctônicas.....	59
6.2	VAN influencia a virulência de <i>Trichosporon</i> spp.....	60
6.3	Efeito da VAN sobre a atividade metabólica e biomassa de <i>T. inkin</i>	61
6.4	Efeito da VAN sobre a atividade metabólica e biomassa de <i>T. asahii</i>	63
6.5	VAN aumenta o número de células persistentes em biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i>	64
6.6	VAN aumenta a tolerância de células persistentes de <i>Trichosporon</i> à AMB....	65
6.7	Estrutura dos biofilmes.....	67
7	DISCUSSÃO.....	70
8	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as infecções fúngicas invasivas (IFIs) tem emergido como um grave problema de saúde em todo o mundo e são consideradas uma causa significativa de morbidade e mortalidade em pacientes gravemente enfermos. Os patógenos do gênero *Candida* são os principais fungos causadores desses tipos de infecção. Contudo, desde 1980, *Trichosporon* spp. têm sido consideradas importantes agentes oportunistas, especialmente em pacientes com doenças hematológicas malignas; neutropenia grave; pacientes com HIV/Aids; pacientes com antibioticoterapia prévia, com próteses valvulares ou cateteres de demora e aqueles em quimioterapia.

Trichosporon spp., são fungos basidiomicetos amplamente distribuídos em diferentes habitats, sendo encontrados no solo, água, madeira em decomposição e excrementos de animais de áreas temperadas e tropicais. Esses fungos também são membros da microbiota humana natural, sendo frequentemente isolados da pele e mucosas tais como: sistema respiratório superior, trato gastrointestinal, sítios perianal e genital. As espécies de *Trichosporon* são mais comumente isolados a partir de infecções superficiais de cabelos e unhas, porém muitas espécies têm sido relacionadas à IFIs, sendo *T. asahii* e *T. inkin* as mais importantes, seguidas por *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. mucoides* e *T. ovoides*. Os principais fatores de virulência exibidos por *Trichosporon* spp., são: a formação de biofilmes, produção de melanina, excreção de enzimas líticas, termotolerância, presença de glucoranoxilomanana (GXM) na parede celular do fungo e sua capacidade pleomórfica. Estes fatores de virulência, associados a imunossupressão do hospedeiro pode agravar o quadro clínico dos pacientes com tricosporonose invasiva. Neutropenia, uso de dispositivos médicos invasivos, malignidades hematológicas, pacientes portadores de vírus da imunodeficiência adquirida e a utilização empírica/a longo prazo de antimicrobianos, favorecem o acometimento de indivíduos por IFIs.

Estudos multicêntricos mostram que a antibioticoterapia prolongada é um importante fator de risco para IFIs, pois a disbiose impulsionada pelos antimicrobianos permite que as espécies da microbiota transitem do estado comensal para o patogênico. Um estudo recente do ano de 2018 conduzido por nosso grupo mostrou que a vancomicina possui influência estimulatória sobre *Trichosporon* spp., o que sugere que a terapia antimicrobiana pode ter um efeito direto na fisiopatologia dos IFIs em pacientes de risco.

A vancomicina é um antibacteriano da classe dos glicopeptídeos, amplamente utilizado na rotina médica para o tratamento e prevenção de infecções causadas por bactérias Gram positivas. Entretanto, alguns estudos sugerem que a vancomicina é capaz de causar alterações na mucosa do trato gastrointestinal, desencadeando uma desordem no processo de homeostase do indivíduo, favorecendo o aparecimento de IFIs ocasionados por fungos, destacando-se os do gênero *Candida* e *Trichosporon*, de modo que, estes fungos, uma vez comensais na microbiota do hospedeiro, podem tornar-se patogênicos. Considerando o aspecto oportunista das IFIs por *Trichosporon* spp., o presente estudo teve como objetivo investigar se a vancomicina é capaz de estimular o crescimento e a virulência de *T. inkin* e *T. asahii*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trichosporon* spp: Aspectos históricos

A palavra *Trichosporon* possui ancestralidade grega, o qual *trichos* vêm de pelos e *sporon* de esporos (COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011). Contudo, a primeira descrição histórica de *Trichosporon* spp. aconteceu em Londres, por Beigel no ano de 1865. Na ocasião, esse microrganismo encontrava-se em forma de nódulos brancos aderidos a perucas de cabelo humano. No ano seguinte, em 1866, Ernst Hallier, em homenagem a Beigel, nomeou o patógeno de *Sclerotium beigelii*, sendo reconhecido como um patógeno fúngico causador da *pedra* branca (SIDRIM; ROCHA, 2004; VAZQUEZ, 2010). Por conseguinte, em 1867 o micologista e botânico alemão Gottlob Ludwig Rabenhorst isolou um microrganismo proveniente de cabelos de peruca e o nomeou de *Pleurococcus beigelii* (GUÉHO et al., 1992). Depois, em 1870, Gustav Behrend avaliou um paciente com *pedra* branca, na ocasião o fungo encontrava-se na barba do indivíduo e foi classificado de *Trichosporon ovoides* (BEHREND, 1890; COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011).

No decorrer dos anos houveram outros relatos de outras espécies deste gênero. Após observar casos de infecções que acometiam os pelos de bigodes, em 1902, Vuillemin, baseando-se nos estudos anteriores, definiu que todas as outras espécies já descritas de *Trichosporon* tratavam-se de variações baseadas em uma mesma espécie, assim, denominada de *Trichosporon beigelii* (GUÉHO; DE HOOG e SMITH, 1992).

Passando-se os anos, em 1910, Charles Lucien de Beurmann, micologista e dermatologista, conseguiu isolar um fungo de lesões cutâneas e o nomeou de *Oidium cutaneum*, este por sua vez, foi nomeado de *Trichosporon cuntaneum*, por ter sido encontrado em lesões na pele (BEURMANN, GOUGEROT e VAUCHER, 1910). Diante dessa nova nomenclatura, ao isolar-se *Trichosporon*, independente do sítios de isolamento, de algum indivíduo, logo, eram relatados como *Trichosporon beigelii* ou *Trichosporon cutaneum*, pois na época acreditava-se que ambos eram sinônimos e durante anos esse conhecimento foi mantido (GUÉHO et al., 1994; COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011).

Em 1992, um grupo de estudiosos liderado por Eveline Guého propôs a revisão taxonômica do gênero fúngico *Trichosporon*. Assim, por intermédio de técnicas moleculares bastante robustas, como reassociações DNA / DNA e sequências parciais de

RNA ribossomal 26S, esses estudiosos identificaram um vasto número de espécies correspondentes a esse gênero, e na ocasião a espécie *Trichosporon beigeli* foi excluída da classificação (GUÉHO et al., 1992; MARINÉ et al., 2015b). De todas as espécies descobertas, haviam seis que apresentavam destaque no que diz respeito a sua relevância patogênica e frequência de isolamento, sendo estas: *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum* e *T. mucoides*, todas capazes de ocasionar doenças em seres humanos (GUÉHO et al., 1994).

Análises genéticas e moleculares subdividiram o gênero *Trichosporon* em cinco clados: *cutaneum*, *ovoides*, *brassicae*, *gracile* e *porosum*, os quais possuem 51 espécies e destas 17 representam maior importância na clínica médica: *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. mucoides*, *T. dermatis*, *T. loubieri*, *T. jirovecii*, *T. montevideense*, *T. mycotoxinovorans*, *T. domesticum*, *T. japonicum*, *T. coremiiforme*, *T. dohaense*, *T. lactis* e *T. faecale* (COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011; TAVERNA, 2014; MARINÉ et al., 2015).

Um estudo realizado por Liu et al., (2015) avaliou novamente o processo taxinômico deste gênero fúngico e estabeleceram novos gêneros para os clados monofiléticos já existentes, incluindo: *Trichosporon*, *Cutaneotrichosporon* e *Apiotrichum*.

2.2 Fungos do Gênero *Trichosporon*

2.2.1 Generalidades

Os fungos do gênero *Trichosporon* pertencem ao filo Basidiomycota subfilo Agaricomycotina, classe Tremellomycetes, ordem Trichosporonales e família Trichosporonaceae (TAVERNA et al., 2014). São responsáveis por ocasionar uma micose superficial que acometem os pelos, como os do cabelo, barba, cílios, axila e regiões íntimas, com a ausência de reações inflamatórias, hora assintomáticas, sendo as principais queixas dos pacientes apenas o lado estético (SIDRIM; ROCHA. 2004; SILVESTRE JUNIOR; MIRANDA, 2010; MATTEDE et al., 2015).

Dentre as 17 espécies patogênicas envolvidas em quadros clínicos hospitalares, destacam-se *T. asahii*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. mucoides* e *T. ovoides*, representadas na figura 1 (COLOMBO; PADOVAN; CHAVES. 2011). Dentre as espécies que causam infecções sistêmicas destacam-se *T. asahii* e *T. mucoides*, quando

associadas a imunodepressão (TAMBE et al., 2009; INÁCIO; 2015). *T. asahii* é relatada como a de maior virulência, devido a sua capacidade de infectar a corrente sanguínea e causar quadros de fungemia chegando a ser de alta letalidade (LOPES, 2018).

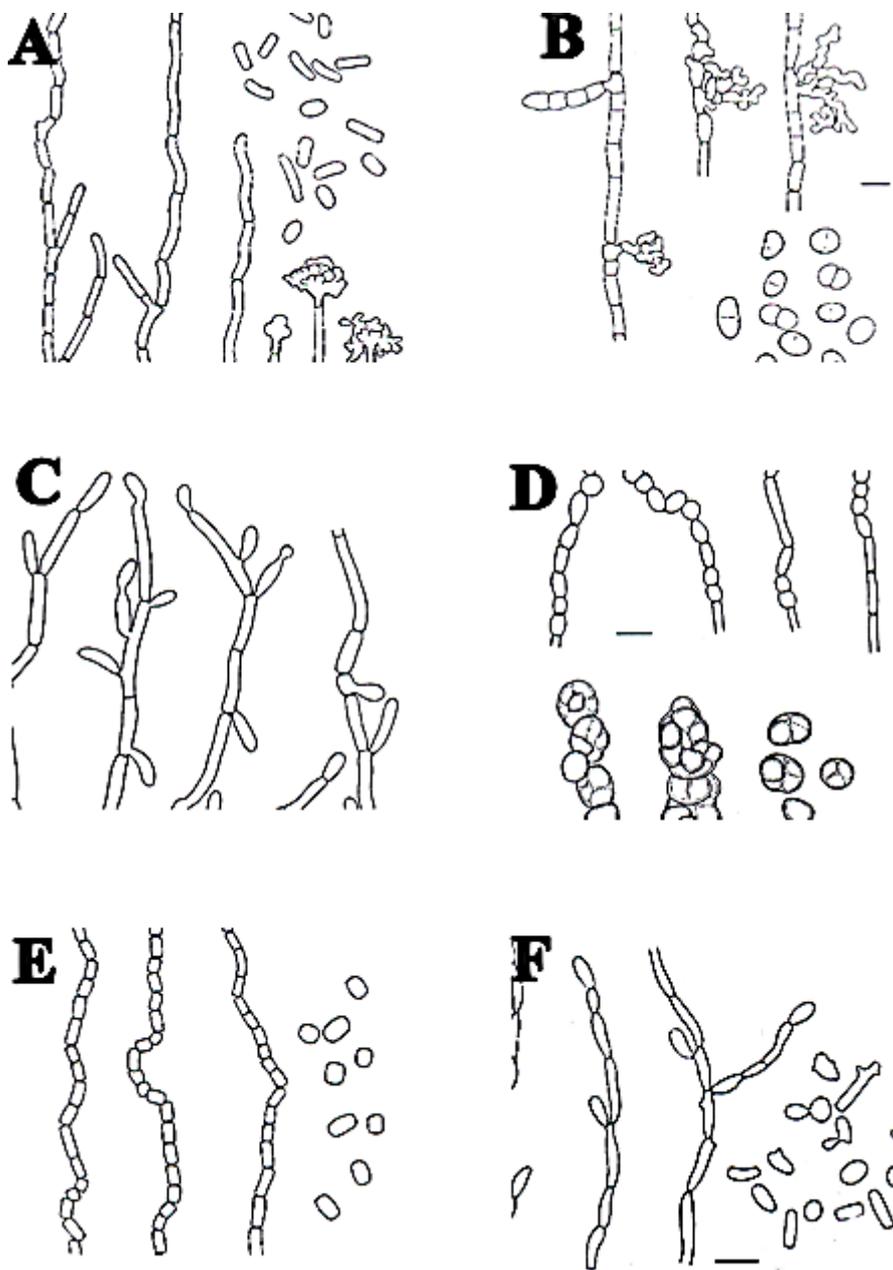


Figura 1. Estruturas microscópicas de *Trichosporon* spp. (A) *T. ovoides*: hifas septadas, artroconídios, apressórios; (B) *T. inkin*: hifas septadas, apressórios e sarcinas; (C) *T. cutaneum*: hifas septadas, blastoconídios clavados; (D) *T. asteroides*: hifas septadas e crescimento meristemático; (E) *T. asahii*: hifas septadas e artroconídios; (F) *T. mucoides*: hifas septadas e blastoconídios clavados. Fonte: Magalhães, 2008.

Os fungos do gênero *Trichosporon* encontram-se vastamente distribuídos pela natureza em ambientes tropicais e temperados, no solo, água, madeiras em decomposição, excreta de animais e outros. (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011). Nos seres vivos, fazem parte da microbiota da pele e mucosas, tais como: sistema respiratório superior, trato gastrointestinal, áreas genitais e perianais (CHO, MATSUKURA e SUGITA, 2015). Embora, a maioria seja caracterizado como saprófito, não invasivo, o fato de colonizar as principais regiões anatômicas do corpo humano, *Trichosporon* spp, pode passar do estado comensal a patogênico em casos de disbiose, sendo responsável por infecções sistêmicas oportunistas (GUÉHO et al., 1994; COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011).

2.2.2 Fatores de virulência

A virulência é um conjunto de fatores expressados pelos microrganismos refletindo em seu grau de patogenicidade no que tange os danos causados no hospedeiro, burlando o sistema imunológico. Para tanto, condições bioquímicas e fisiológicas estão envolvidas nesse processo juntamente com ambientes e atmosferas favoráveis para o seu desenvolvimento (MADIGAN et al., 2010; BENTUBO et al., 2014).

Trichosporon spp. exibem fatores de virulência que, associado a diminuição do sistema imune, favorecem as infecções ocasionadas por este patógeno, destacando as IFIs. O crescimento na forma de biofilme é o principal fator de virulência (LAGREE; MITCHELL, 2017; MONTOYA et al., 2018; GALDIERO et al., 2020). Adicionalmente, *Trichosporon* produz um importante polissacarídeo em sua parede celular – o glucoranoxilomanano (GXM) – capaz de suprimir a resposta imune do hospedeiro (FONCESA et al., 2009; ZIMBRES et al., 2018). Outros elementos de agressão ao hospedeiro incluem: a termotolerância, secreção de enzimas líticas extracelulares (CORDEIRO et al., 2015), mudança de fenótipo (*switching fenotípico*), sua habilidade pleomórfica (resultando na produção de hifas) e produção de melanina (CARVALHO et al., 2014; MARINÉ, 2015a; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017; MONTOYA et al., 2018).

O GXM é um polissacarídeo encontrado na parede celular das espécies de *Trichosporon*, semelhante ao encontrado como antígeno da cápsula de *Cryptococcus* spp., constituído por um hexassacarídeo do tipo α 1,3-D-manano substituído por um resíduo de

ácido β 1,2-glucopiranosilurônico e seis unidades de β -D-xilopiranosil. (ICHIKAWA et al., 2001). Este, por sua vez, reduz o poder fagocítico das células de defesa, como os neutrófilos e os monócitos, facilitando o processo infeccioso. Entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na patogenicidade e virulência deste polissacarídeo em *Trichosporon* spp. (FONCESA et al., 2009; ZIMBRES et al., 2018).

O *switching fenotípico* de *Trichosporon* spp. está ligado ao seu processo de patogênese, a troca fenotípica regula genes como *SAP1* e *SAP3*, ligado a características como a capacidade de adesão celular desse patógeno facilitando a invasão e a formar de burlar as defesas do hospedeiro (ICHIKAWA et al., 2004).

As principais enzimas líticas secretas por *Trichosporon* spp. são, proteases, lipases, fosfolipases, DNase, esterases e hemolisinas. Esta aptidão pode elevar o potencial de virulência deste patógeno, uma vez que, a quebra de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, lise de hemácias e clivagem das ligações do DNA, podem favorecer a invasão e disseminação fúngica nos tecidos (MARINÉ, 2015a; CORDEIRO et al., 2015; MONTOYA et al., 2018).

A melanina é um composto responsável por garantir uma pigmentação escura, variando de preto a marrom. Sabe-se que este composto está presente em alguns fungos, denominados de fungos demáceos, como também, podem ser produzidos por outros fungos (produtores de melanina), como as espécies de *Cryptococcus* na presença de compostos fenólicos, por exemplo, L-DOPA (CASADEVALL et al., 2000; BRILHANTE et al., 2017). Além disso, Carvalho et al (2014), relatam a produção de melanina em *Trichosporon* spp. na presença do composto L-DOPA. Levando em consideração a presença deste composto em outras espécies fúngicas, suspeita-se que a melanina atue interferindo na ação dos antifúngicos, (tendo em vista que este composto é produzido e armazenado na parede celular fúngica, o que dificulta a penetração dos fármacos) e servindo como válvula de escape do sistema imune do hospedeiro burlando os macrófagos, dificultando o processo de opsonização.

A habilidade que as espécies de *Trichosporon* spp. possuem de crescer em determinadas superfícies formando uma estrutura complexa, robusta e tridimensional que é capaz de adequar-se a estresses ambientais, denominada biofilme, é um dos seus principais fatores de virulência, uma vez que este tipo de agrupamento torna algumas

drogas comumente utilizadas na clínica médica ineficientes (LAGREE; MITCHELL, 2017; MONTOYA et al., 2018; GALDIERO et al., 2020).

2.2.3 *Biofilmes*

Entende-se por biofilmes comunidades microbianas sésseis compostas por milhões de células, organizadas, estruturadas, e altamente complexas, envoltas por uma matriz polimérica extracelular (FANNING; MITCHELL, 2012; LAGREE; MITCHELL, 2017). Estes têm a capacidade de se aderir a superfícies bióticas e abióticas, podendo se fixar a dispositivos médicos de importância como: cateteres, dentaduras, implantes, marcapassos e dispositivos médicos no geral. Diversos microrganismos são capazes de formar um biofilme. Dentre os fungos destacam-se: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pneumocystis*, *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, e várias espécies de *Candida*, sendo estes os que possuem uma maior importância clínica (MONTOYA et al., 2018; GALDIERO et al., 2020). Estima-se que 80% dos microrganismos presentes no meio ambiente organizem-se deste modo (DONLAN, 2002).

Como já relatado anteriormente, a associação destes patógenos em forma de biofilme dificulta o tratamento antimicrobiano, uma vez que células sésseis expressam até 1000 vezes mais resistência aos antifúngicos testados, como os azólicos, quando comparado as células planctônicas (ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; FANNING; MITCHELL, 2012). Levando-se em consideração a diferença entre células sésseis e planctônicas, a formação dos biofilmes trata-se de uma estratégia de sobrevivência dos microrganismos. Desse modo, os microrganismos são capazes de se proteger contra impactos ambientais, estresse químico/físico, expressão gênica além de tudo adquirem características fenotípicas únicas, como a morfologia das colônias (RAMAGE et al., 2009). A presença da matriz extracelular polimérica, a estrutura altamente complexa e a regulação dos genes associados as bombas de efluxo estão entre os fatores que contribuem para o processo de resistência (intrínseca ou não) dos biofilmes fúngicos, uma vez que, os diversos gêneros fúngicos podem apresentar características distintas de resistência a uma ou mais classe de antimicrobianos (FANNING; MITCHELL, 2012)

Os biofilmes são divididos em camadas de células com atividade metabólica diferenciada (figura 2). Dentre estas, a última camada encontra-se em estado de

dormência em sua porção final e podem resistir a altas concentrações das drogas. Alguns estudos têm sido realizados para a detecção das células persistentes com finalidades de medir a dose dependente de um agente microbiano, levando em consideração a cronicidade das doenças. A exemplo temos alguns testes realizados com algumas espécies de *Candida*: teste de sensibilidade planctônica e quantificação da unidades formadoras de colônia. Porém a fisiologia e todas as vias que estão envolvidas na indução dessas células ainda é pouco conhecida (AL-DHAHERI; DOUGLAS, 2008; BARTH JUNIOR, 2014. GALDIERO et al., 2020).

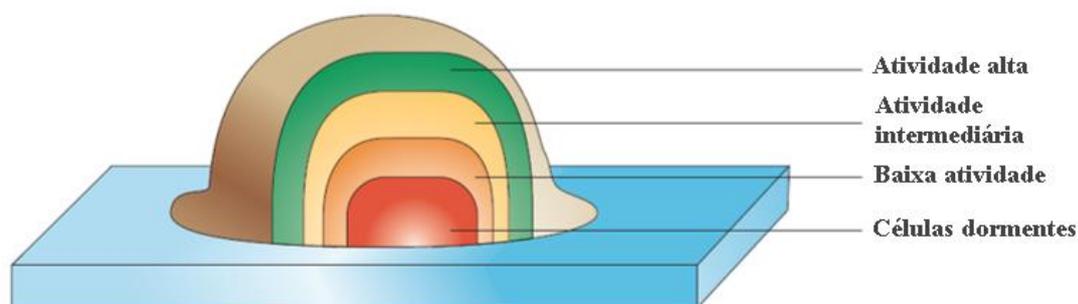


Figura 2. Atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme. Atividade metabólica em um aglomerado de células de biofilme é uma função da profundidade dentro do biofilme e é influenciada pelo transporte de nutrientes. Células nas bordas de uma microcolônia na interface do líquido a granel são os mais ativos. Células dentro da microcolônia pode permanecer dormente e fornecer um núcleo para regeneração após tratamento com antibióticos. Fonte: Davies, 2003.

Um estudo *in vitro* realizado por Kwan et al. (2013) com *Escherichia coli* evidenciou que células com ausência de síntese proteica tornam-se persistentes. A presença de células persistentes em biofilmes mesmo após o tratamento com as drogas de escolha, acontece pela sua falta de metabolismo, assim elas permanecem dormentes e inativas até que a droga seja removida (WOOD, 2017).

Em biofilmes de *Candida* spp, por exemplo, a presença de células persistentes é evidenciada através da utilização de Anfotericina B, de forma que esta droga age se ligando sequestrando o ergosterol da célula fúngica, facilitando o aparecimento de colônias resistentes, se for o caso (ANDERSON et al., 2014). Em busca de novas alternativas terapêuticas, diversos estudos têm mostrando que a ação de outros compostos isoladamente, e/ou em associação com os antifúngicos, apresentam efeitos satisfatórios

contra os biofilmes fúngicos (SANTANA et al., 2015; ALMEIDA et al., 2017; CORDEIRO et al., 2019; BRILHANTE et al., 2020).

2.2.4 Infecções ocasionadas por *Trichosporon* spp.

Infecções relacionadas por *Trichosporon* spp., estão ligadas a diversos tipos de manifestações como superficiais (cutâneas), lesões no pelo e onicomicoses que acometem indivíduos com o sistema imunológico hábil e infecções invasivas de largo espectro que afetam pacientes imunocomprometidos (WOLF et al., 2001; FAGUNDES JÚNIOR, et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2016; FOSTER et al., 2018; FERREIRA et al., 2019).

A infecção superficial ocasionada por fungos deste gênero é uma tricopatia pura denominada de *pedra* branca. Infecta igualmente pacientes de ambos os sexos e de todas as faixas etárias. Esta infecção já foi relatada em diversos continentes, desde a América do Sul, América do Norte, Sul da Ásia até a Austrália. No Brasil, a maioria dos casos são no Rio de Janeiro, São Paulo, Paraíba e em outros Estados (ZAITZ et al., 1998; DINIZ; SOUZA FILHO, 2005; INÁCIO, 2015). Em animais, como os macacos e cavalos, foi relatada destruição e queda dos pelos, porém não foi documentada a transmissão de animais para os seres humanos (KAPLAN et al., 1959; ZAITZ et al., 1998).

A *pedra* branca é caracterizada pela presença de nódulos grossos e esbranquiçados, medindo em torno de 1 a 2 mm de diâmetro. São nódulos fracamente aderidos aos pelos, do tipo ectotrix, de diversas regiões do corpo dos indivíduos infectados. Não são relatadas nem identificadas alterações a nível de folículo piloso, apenas descamações devido ao ressecamento da pele (DINIZ; SOUZA FILHO, 2005). Os nódulos de *pedra* branca apresentam aglomerados de blastoconídios e artroconídios. Estes, por sua vez, mantem-se unidos aderindo o pelo devido uma substância liberada pelas hifas (SCHWARTZ, 2004). Além desses quadros de infecções superficiais, este patógeno pode causar sérios quadros após ganharem a corrente sanguínea (devido a um desequilíbrio imunológico), como encefalite, comprometido renal, pneumonias, endocardites, peritonites, otomicoses e as mais diversas infecções sistêmicas (MORI, et al., 2005; YANG, GAO e LI, 2014; FERNANDES et al., 2018). Geralmente são consequências de colonizações deste patógeno no sistema respiratório e trato gastrointestinal (WALSH et al., 2004).

2.3 Infecções fúngicas invasivas

A proliferação e disseminação fúngica está ligada a alguns fatores ambientais como o uso abusivo de antibióticos, pacientes que tem seu tempo de internamento prolongado, negligência em relação a medidas de biossegurança, neutropenia, nutrição parenteral, o qual o paciente se alimenta por outra via que não seja a convencional (acesso venoso), dentre outros (SILVA, 2017). Como forma proliferativa dos fungos, têm-se a fungemia, que é caracterizada como a presença, disseminação e proliferação desses patógenos na corrente sanguínea. Estes por sua vez, burlam as defesas do hospedeiro debelando o sistema fagocitário para migrarem e ocasionarem infecções em diversos sítios anatômicos, dependendo do seu tropismo (PFALLER; CASTANHEIRA, 2015).

Nos últimos anos, as infecções fúngicas invasivas (IFIs) têm se tornado um grave problema de saúde em todos os países do mundo, evidenciando altos índices de mortalidade (PAPAS et al., 2018; NICHELLE; ZIMMERMANN; BRUCKER, 2019). Estima-se que anualmente as IFIs ocasionam aproximadamente 1,5 milhões de óbitos, o que sugere falhas no diagnóstico e/ou tratamento dessas infecções (CAMPOY E ADRIIO, 2016; ROBBINS, WRIGHT E COWEN, 2016; CHANG et al. 2017).

Candida spp., é o fungo mais prevalente causador de IFI, (destacando-se *C. albicans*) aproveitando-se de episódios de imunossupressão do hospedeiro, nos quais podem se dar devido ao uso prolongado de antimicrobianos, neutropenia, lise da barreira das mucosas e/ou a formação de biofilmes aderidos a dispositivos médicos. Outras espécies de *Candida* que podem ser encontradas de forma secundária nesses casos são, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (UPPULURI et al., 2010; RAMAGE et al., 2012), contudo, nas últimas décadas, outras espécies fúngicas têm emergido como importantes agentes de IFIs, tais como Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp., *Pneumocystis* spp., *Paracoccidioides* spp., *Histoplasma* spp., *Malassezia* spp. *Rhodotorula* spp., e principalmente *Trichosporon* spp. (ESSER; KURZAI, 2014; MERSEGUEL et al., 2015; ENOCH et al., 2017).

Candida spp, são fungos ascomicetos, pleomórficos, com mais de 200 espécies descritas, encontrados em diversas regiões do corpo humano: pele, mucosa oral e genital, trato gastrointestinal e sistema respiratório. As 5 principais espécies de *Candida* (já

descritas anteriormente) são responsáveis por até 92% das infecções (superficiais e sistêmicas) ocasionadas por este patógeno (PAPON et al., 2013; MERSEGUEL et al., 2015).

Os fungos do Complexo *Cryptococcus neoformans/gattii*, são leveduras encapsuladas capazes de infectar humanos e animais. O processo infeccioso dar-se, principalmente, em decorrência da presença dos fatores de virulência que este patógeno possui, como a cápsula que lhe protege contra a fagocitose dos leucócitos, produção de melanina na presença de compostos fenólicos, termotolerância, com consequente resistência a alguns antifúngicos (PEREIRA; BARROS, 2012; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

As leveduras do gênero *Trichosporon* são a espécie não-*Candida* mais isolada em recém-nascidos e em pacientes transplantados, entretanto são principalmente isoladas em pacientes com doenças hematológicas e neutropênicos febris (GROSS; KAN, 2008). Desde meados da década de 1980, no entanto, espécies de *Trichosporon* tem sido relacionadas a quadros de IFIs, principalmente em pacientes com neoplasias hematológicas, portadores de vírus HIV/Aids, neutropênicos em tratamento quimioterápico, pacientes em uso de corticóides sistêmicos e/ou antibioticoperapia empírica / prolongada (ALMEIDA JÚNIOR, 2016; CHALLAPILLA et al., 2019), ocasionando letalidade superior a 70% nesses grupos (ALMEIDA JÚNIOR; HENNEQUIN, 2016). As IFIs por *Trichosporon* são graves e possuem prognóstico reservado; dados da literatura mostram que os pacientes acometidos podem evoluir para falência de múltiplos órgãos, ocasionando, frequentemente, um desfecho fatal (FAGUNDES-JÚNIOR et al., 2008; PARAHYM, 2016; PISTORI, 2019).

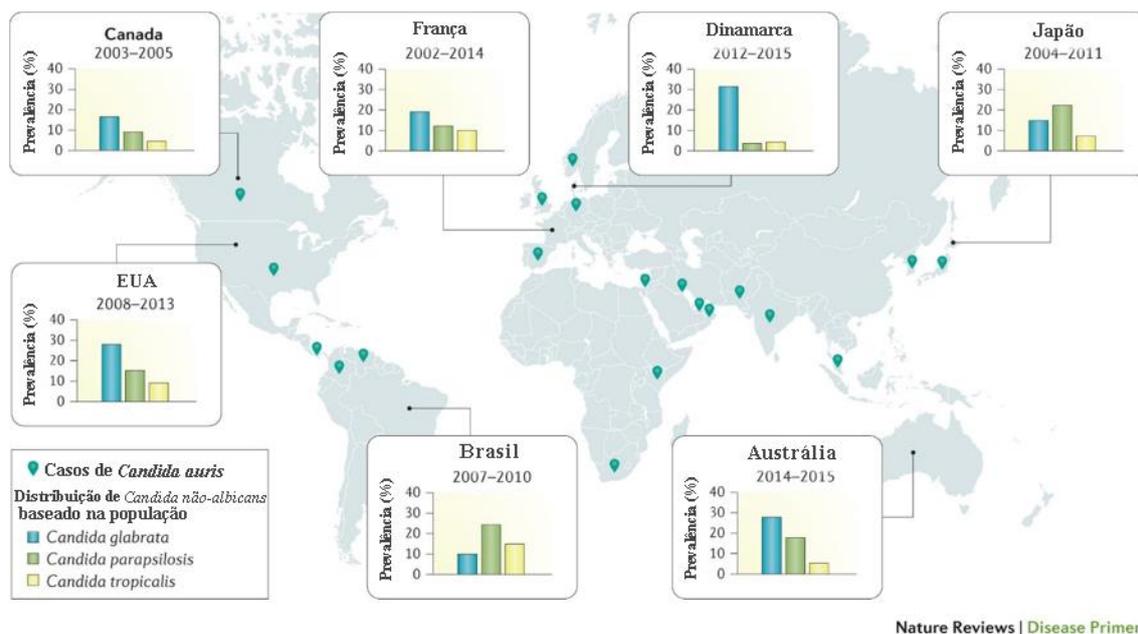
A antibioticoterapia prolongada e/ou o uso indiscriminado dos antibióticos podem predispor os indivíduos a serem acometidos por alguma IFI, uma vez que fungos do gênero *Candida* e *Trichosporon* fazem parte da microbiota normal do corpo humano e de outros animais de sangue quente. Todavia, em ocasiões como estas em que há um desequilíbrio do binômio parasito/hospedeiro, estes microrganismos tornam-se patogênicos, se disseminam por via hematogênica e comprometem diversos órgãos como, cérebro, coração, pulmão e rins (FURLANETO-MAIA, 2007; JUNG et al., 2015; PFALLER; CASTANHEIRA, 2015).

O manejo terapêutico das IFIs por *Trichosporon* spp. representa um desafio, haja vista a resistência intrínseca de diversas espécies às equinocandinas, como também a anfotericina B (MONTOYA et al., 2018; PISTORI, 2019). Deste modo, os triazólicos (voriconazol, fluconazol, posaconazol e itraconazol) têm sido considerados os antifúngicos de escolha para o tratamento de IFIs por esses agentes (MARINÉ et al., 2015b; ALMEIDA JÚNIOR e HENNEQUIN, 2016). Dados da literatura atestam que a refratariedade / falha terapêutica é comum quando do tratamento tricosporonoses invasivas por anfotericina B (HOY et al., 1986, GIRMENIA et al., 2005); episódios de infecção tipo *breakthrough* após a administração de equinocandinas, também têm sido descritas (WALSH et al., 2004; COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011) Destaca-se também o emprego da Anfotericina B, embora estudos comprovem que alguns isolados possuem resistência ao tratamento (CHAGAS-NETO et al., 2009; SUZUKI et al., 2010; ATEHORTUA et al., 2017).

2.3.1 Epidemiologia das infecções fúngicas invasivas

Papas et al (2018) apresentaram uma distribuição geográfica (figura 3) sobre o acometimento de IFIs ocasionadas por *Candida* spp. Os autores evidenciam a constante prevalência de *Candida albicans* e um aumento considerável em outras espécies fúngicas. A exemplo, *C. glabrata* é a segunda espécie mais isolada nos Estados Unidos e no noroeste da Europa, acometendo pacientes acima de 60 anos. As IFIs acometeram indivíduos adultos e pediátricos que apresentam os fatores predisponentes já conhecidos que favorecem este tipo de infecção. *C. krusei* possui menor prevalência entre as espécies de *Candida*, com frequência de isolamento em pacientes oncológicos (PFALLER et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2016).

Contudo a maior preocupação é o aparecimento de infecções ocasionadas por *C. auris* devido a sua alta capacidade de disseminação hematogênica com posterior comprometimento de órgãos, dificuldade diagnóstica e sua multirresistência ao tratamento antimicrobiano com equinocandinas, azólicos e poliênicos (CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017; LOCKHART et al., 2017). Ademais, diversos pesquisadores realizam estudos de coleta de dados, de corte, retrospectivo e de revisão bibliográfica sobre casos de candidemia invasiva por todo o mundo com pacientes adultos e pediátricos e ambos os sexos (KULLBERG; ARENDRUP, 2015; MCCARTY; PAPAS, 2016; RIOS; ROMANELLI, 2016).



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 3. Variação e distribuição geográfica de espécies de *Candida*. Os dados apresentados são da Austrália, Brasil, Canadá, Dinamarca, França, Japão e Estados Unidos. Os dados sobre *C. auris* são dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças. Dentre as espécies de *Candida*, *C. albicans* é a espécie mais prevalente associada à candidíase invasiva. Um número crescente de países relatou casos de infecção por *Candida auris*, Fonte: Papas et al (2018).

O caso pioneiro de infecção disseminada por *Trichosporon*, spp. foi ocasionado por *T. cutaneum*, que na ocasião foi o causador de um abscesso cerebral. A paciente era uma mulher de 39 anos portadora de um adenocarcinoma de pulmão, que foi a óbito após 4 semanas de internação (WATSON e KALLICHURUM, 1970). Depois disso, outros relatos foram surgindo na literatura. Em 1974, foi relatado o primeiro caso de *Trichosporon cutaneum* em um menino de 12 anos, portador de leucemia linfocítica (RIVERA e AYTEN, 1975), em 1980 Evans e seus colaboradores descreveram dois casos de tricosporonose invasiva, ambos os pacientes eram portadores de leucemia, submetidos a tratamentos quimioterápicos, faziam uso de antibióticos e apresentavam quadros febris. Em 1989, foi documentado o primeiro relato de tricosporonose em paciente portador da Aids, dentre outros até os dias atuais (LEAF e SIMBERKOFF, 1989).

Krcmery Júnior e seus colaboradores (1999) realizaram um estudo relacionado ao instituto do câncer e mostraram que *Trichosporon* spp., foram os fungos não-*Candida* mais isolados de pacientes com fungemia. Outro estudo realizado por Cox e Perfect (1997), mostrou que as fungemias causadas por *Trichosporon* spp. progridem mesmo após a terapia farmacológica com Anfotericina B, um antifúngico com ação fungicida

utilizado em casos de infecções disseminadas. Fagundes Júnior et al. (2008) ressaltam que as infecções disseminadas têm emergido de forma gradativa por fungos que até então eram incomuns, como *Trichosporon* spp. Estes autores descrevem em seu estudo um caso de *T. asahii* em paciente idosa portadora de insuficiência cardíaca e hipertensão arterial que estava internada em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Esta paciente apresentou insuficiência renal aguda, respiratória e urinária. Passados 7 meses de internação, a paciente foi acometida por um choque séptico associado a infecção urinária por *T. asahii*. O tratamento foi realizado com Anfotericina B, vancomicina e imipenem, entretanto não obteve melhora e após 18 dias de tratamento apresentou falência múltipla de órgão e foi a óbito.

Por conseguinte, diversos pesquisadores dedicaram seus estudos na busca ativa para casos de tricosporonose. Um deles, é um estudo realizado por Liao e seus colaboradores (2015) que mostrou 185 episódios de infecções disseminadas por *Trichosporon* spp., entre os anos de 1975 e 2014 ocorridos na América do Norte, Europa, Ásia e América do Sul, estes mostraram condições que lhes tornaram susceptíveis como: doenças hematológicas, uso de antibióticos, neutropenia, tratamento quimioterápico, uso de cateter, crianças prematuras, profilaxia com antifúngicos e uso de corticoides, deste total de pacientes, 57,4% eram portadores de alguma malignidade hematológica. Um estudo mais recente liderado por Singh e colaboradores (2019) em um Hospital no Norte da Índia, mostrou uma análise de campo sobre os casos de infecções por *Trichosporon* spp., de forma geral, em um período temporal de 12 anos. Os fatores de risco relatados foram os mesmos do estudo anterior. Observou-se que a tricosporonose invasiva foi documentada em 62,5% dos casos, destes, 57,78% dos isolados foram provenientes de amostras sanguíneas e a espécie mais prevalente foi *T. asahii* (79,16%), por fim o autor destaca a crescente taxa numérica ao decorrer dos anos.

2.4 Diagnóstico laboratorial

Primariamente, o diagnóstico laboratorial dar-se mediante a coleta do pelo, unha, sangue, liquor e outras amostras biológicas a depender do tipo e sítios de infecção. O pelo deve ser observado macroscopicamente com uma lupa, retirado com uma pinça e enviadas para o laboratório para posterior análise. Antes da cultura, deve-se realizar o exame direto da amostra com auxílio do clarificante hidróxido de potássio (KOH) de 10-40%, observada a microscópio óptico na objetiva de 40X. A microscopia deve relevar hifas, blastoconídios e principalmente artroconídios. Para a coleta de unha, deve-se utilizar algum material cortante (tesouras, alicates) e curetas. Neste tipo de coleta procura-se retirar a parte mais infectada da unha, desprezando toda a hiperqueratose. No caso de onicomioses com comprometimento do tipo paroníquia, recomenda-se realizar também a coleta do pus utilizando um *swab* (SIDRIM; ROCHA, 2004; SOMENZI; RIBEIRO; MENEZES, 2006).

O diagnóstico das IFIs por *Trichosporon* depende exclusivamente de técnicas laboratoriais, uma vez que essas infecções não cursam com sinais / sintomas patognomônicos. Indiscutivelmente, a cultura torna-se o padrão ouro para as infecções superficiais e invasivas por *Trichosporon*. Esta, associada a visualização microscópica de elementos característico deste patógeno, como artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudohifa. No que diz respeito as tricosporonoses invasivas o diagnóstico comprovado dá-se por: hemocultura positiva, associada a sintomatologia típica da infecção, cultura fúngica positiva de líquido cefalorraquidiano ou biópsia que apresente achados histopatológicos compatíveis com o fungo (ARNON; LITMANOVITZ, 2008; COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011; IZUMI, HISATA E HAZAMA, 2009; SHABAAN et al., 2018).

Em casos de suspeita de tricosporonose invasiva (destacando como amostra, o sangue) a coleta deve ser realizada preferencialmente antes da administração de algum antimicrobiano, seguindo todas as regras de biossegurança. Recomenda-se a coleta de duas amostras em dois locais distintos. As garrafas de hemocultura devem estar estéreis, sendo pediátricas ou adultas dependendo do paciente. Em adultos o volume deve ser de 10-20 mL distribuídos no número total de garrafas colhidas, em crianças 1,0 a 5,0 mL. Após coleta podem ser incubadas por sistema automatizado: BACTEC® ou BACT/ALERT® que possuem indicador de positividade com reação de Co₂ e alteração

de pH. Na maioria dos casos as amostras contaminadas costumam positivar nas primeiras 24 h (COCKERILL et al., 2004; LEVIN, 2007). Para o método manual deve-se incubar a garrafa em estufa bacteriológica de 37°C durante 7 dias com agitações e observações diárias (CIMOLAI, 2001).

O meio de cultura contido dentro das garrafas de hemocultura é enriquecido comumente com tripticase-soja, peptona, infusão de cérebro e coração (BHI) e caldo Columbia. Além disso, possuem anticoagulantes necessários (como heparina e citrato) para manter o sague viável (KONEMAN et al., 2001).

No caso das hemoculturas, após a positivação, realiza-se a confecção de uma lâmina pela técnica de GRAM para a visualização de estruturas leveduriformes sugestivas da infecção (PEREIRA et al., 2009). Para mais, as amostras (independente do sítio de coleta) deveram ser cultivadas em uma tríade: Ágar Sabourand, Ágar Sabourand acrescido de cloranfenicol (este inibirá o crescimento bacteriano na presença do antibiótico) e Ágar Sabourand contendo cloranfenicol e cicloeximida, chamado também de Mycosel (inibindo a presença de bactérias e fungos anemófilos), observa-se o crescimento durante 5 a 7 dias. (CANO-PALLARES et al., 2016; FERREIRA et al., 2019).

Macroscopicamente, as colônias cultivadas em ágar sabourand dextrose tem crescimento variável de 2 a 7 dias e possuem aparência cerebriformes ou rugosas com coloração que varia de branca à bege, com aspecto seco ou rugoso (GUÉHO et al., 1992; DE HOOG et al., 2000). Quando semeadas em meio CHROMagar *Candida*® (BD Diagnostic Systems-França) adquirem coloração azulada, mas, sua cor pode variar até verde, a depender da espécie (BENTUBO; GAMBALE; FISCHMAN, 2013).

Trichosporon spp. são fungos leveduriforme, todavia, possuem a habilidade do pleomorfismo, deste modo, microscopicamente apresentam-se em forma de blastoconídios (figura 4A), artroconídios (figura 4B e 4C), hifas verdadeiras (figura 4D) e pseudo-hifas (figura 4E), essas estruturas podem ser vistas todas em apenas uma amostra. (COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011). Além disso, algumas espécies possuem em sua morfologia um apressório (figura 4F) característico desse gênero que auxilia no diagnóstico fenotípico, sua identificação se dá através da técnica de microcultivo em ágar malte (CHAGAS-NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008).

Para a identificação de *Trichosporon* spp. são analisadas características morfológicas, através da visualização macroscópica das colônias, provas bioquímicas,

analíticas e moleculares (ALMEIDA, 2016). Referentes as análises bioquímicas/fisiológicas, estes são não-fermentadores de carboidratos, utilizam a via do metabolismo oxidativo, pois assimilam alguns açúcares como glicose, sacarose, galactose, lactose e maltose. O teste de urease (figura 4G) é realizado em meio ágar ureia de Christensen, sendo positivo para este teste, mostrando que neste o referido gênero é capaz de degradar a ureia através da enzima urease, liberando amônia que se acumula no meio, alterando seu pH tornando-o mais alcalino mudando sua coloração de amarelo para rosa. Isso acontece com todos os basidiomicetos (LACAZ et al., 1998; BENTUBO; GAMBALE; FISCHMAN, 2013).

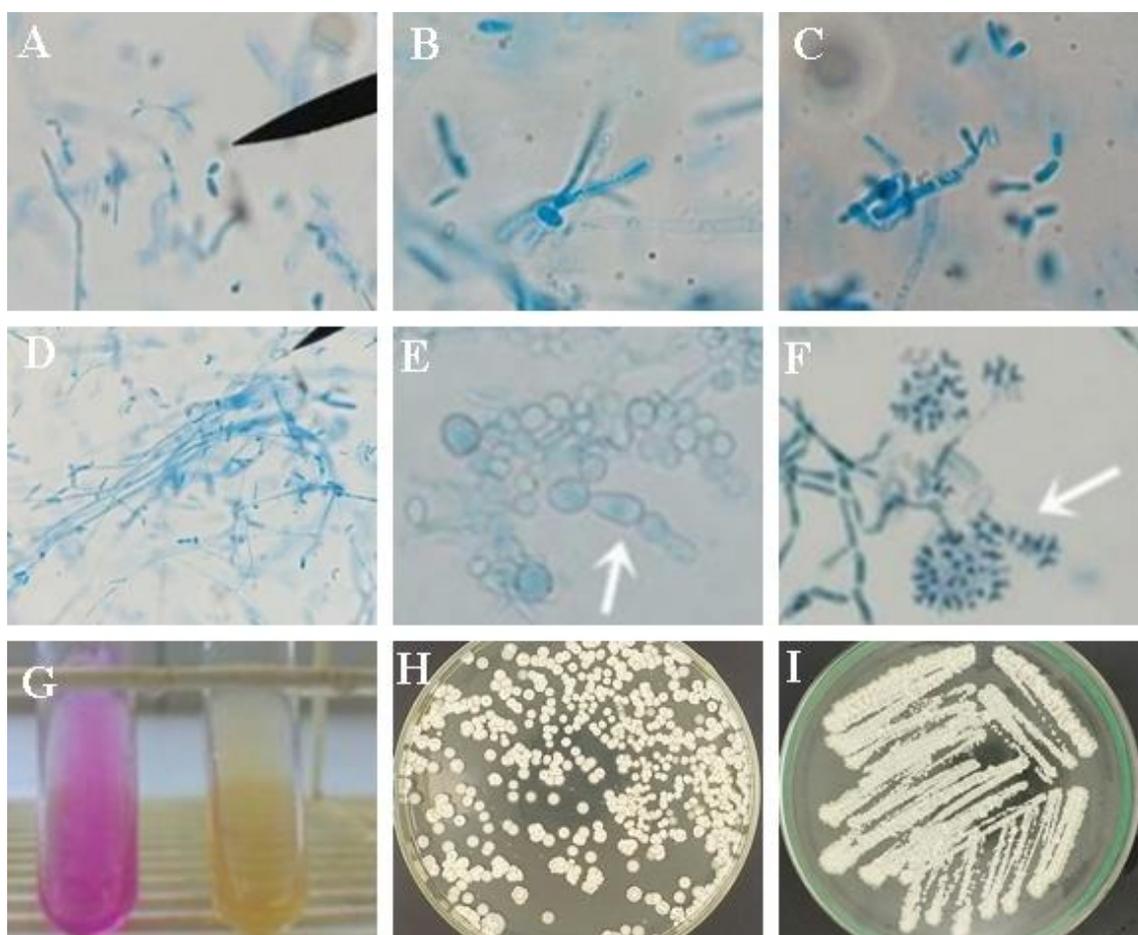


Figura 4. Macro e micromorfologia de *Trichosporon* spp. (A) blastoconídios; (B) e (C) artroconídios (D) hifas verdadeiras; (E) pseudo-hifas; (F) presença de apressório; (G) teste de urease; (H) e (I) morfologia das colônias de *Trichosporon* spp.

Fonte: Próprio autor, 2020; Serpa, 2016.

O diagnóstico molecular é tido como o mais preciso quando se deseja chegar a nível de espécie. A técnica por reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polimerase chain reaction*), é uma das mais utilizadas para esse tipo de diagnóstico. Tratando-se de

Trichosporon spp., as regiões de interesse a serem analisadas são as do DNA ribossomal 26S e 5S, associadas as regiões de ITS (*Internal Transcriber Spaces*) e IGS (*Intergenic Spaces*), representado na figura 3. Outra combinação que pode ser utilizada são as D1/D2 associadas as regiões ITS e IGS1 (COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011; DABAS, XESS e KALE, 2017).

Complementar a isso, a técnica de espectrofotometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz, também conhecida como MALDI-TOF, permite a análise de moléculas proteicas, através do seu peso molecular, mostrando-se rápida e precisa com alta confiabilidade e reprodutibilidade para fins diagnósticos (TAVERNA et al., 2014; WANG et al., 2016).

2.5 Tratamento

Apesar dos fatores de transmissão ainda não serem totalmente conhecidos, sabe-se que o calor, umidade, a utilização de compostos oleosos e os maus hábitos higiênicos quando associados a um ambiente tropical, colaboram para a proliferação das infecções superficiais ocasionadas por *Trichosporon* spp. O tratamento recomendado para *pedra branca* é o corte dos cabelos ou pelos e a utilização de xampu de cetoconazol (PONTES et al., 2002; FERREIRA et al., 2019). Os antifúngicos clássicos, quando aplicados por via tópica para o tratamento das onicomicoses, não apresentam efeitos (ROSEN et al., 2015). No entanto, amorolfina e ciclopirox, apresentados em forma de vernix conseguem ter ação. Por via oral, os fármacos disponíveis são a terbinafina, itraconazol e fluconazol. Uma inovação para o tratamento dessa infecção é efinaconazol e tavaborol. Estes compostos, mostraram atividade antifúngica com uso tópico, foi testado e aprovado pela entidade reguladora competente *Food and Drug Administration* (FDA) (PERUSINHA; ROSADO; LENCASTRE, 2019).

Já o tratamento das IFIs é desafiador, levando em consideração a dificuldade/erros diagnósticos das IFIs. Sabe-se que *Trichosporon* spp. possuem resistência intrínseca as equinocandinas e esta mesma classe é ineficaz contra espécies de *Cryptococcus*. No que diz respeito aos azólicos, sua utilização tanto profilática quanto terapêutica pode favorecer o crescimento de *Candida* spp. resistentes a fluconazol, sendo considerada uma grave ameaça (DAY et al., 2013).

Os poliênicos são uma classe de antifúngicos naturais, com ação fungicida ampla, relatado desde 1950. (CAMPOY e ADRIO, 2016). Antigamente achava-se que a capacidade hidrofóbica e hidrofílica eram as principais responsáveis pela interação dos fármacos com o ergosterol da célula fúngica que resultaria na formação de poros e por fim, morte celular (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010). Entretanto, outro estudo concluiu que a habilidade que os poliênicos possuem de causar poros na célula fúngica não é o principal mecanismo, em vez disso, são responsáveis pela formação de agregados que retiram o ergosterol essencial da membrana plasmática do fungo (ANDERSON et al., 2014). Os poliênicos possuem efeitos colaterais de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade devido a semelhança entre o colesterol presente nos mamíferos e o ergosterol (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010), contudo, as doses de Anfotericina B são reajustadas na clínica para garantir eficácia sem grandes efeitos tóxicos. Mesmo com o uso frequente na clínica médica, pouco se têm relatos de resistência aos poliênicos (PERFECT et al., 2010; VINCENT et al., 2013).

Os azólicos agem na biossíntese do ergosterol, mediante bloqueio da enzima citocromo P-450 lanosterol 14- α -desmetilase. Apresentam efeitos fungicidas frente a fungos filamentosos e fungistático frente a leveduras (XIE et al., 2014; CHANG et al., 2017). Esta classe de antifúngico dividem-se em imidazólicos (presença de dois átomos de hidrogênio no anel azólico) ou triazólicos (presença de 3 átomos de hidrogênio no anel azólico). O imidazólicos são utilizados para o tratamento de infecções superficiais, mas não possuem efeito significativo no combate de IFIs, deste modo, recorrem-se aos triazólicos, como o voriconazol, itraconazol e posaconazol (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011). São amplamente empregados em ambientes hospitalares devido sua baixa toxicidade (diferentemente dos poliênicos), contudo, pelo fato de serem comumente utilizados, relatam-se resistência em espécies de *Candida* (CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013; MCCARTY; PAPPAS et al., 2016).

As equinocandinas é a classe de antifúngicos mais recentes no mercado, lançada em 2001. Sua ação dar-se através da inibição da síntese de 1,3- β -D-glucano, polissacarídeo presente na parede celular fúngica. Este bloqueio resulta na morte da célula. Existem 3 tipos de equinocandinas disponíveis no mercado: Caspofungina, Micafungina e anidulafungina. Não apresentam boa absorção quando administradas por

via oral e ineficazes contra *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp. e *Trichosporon* spp. (DENNING, 2003; ROBBINS, WRIGHT e COWEN, 2016).

Estratégias terapêuticas necessitam ser elaboradas, estudadas e testadas. A associação entre medicamentos tem despertado o interesse de pesquisadores por serem uma alternativa frente ao combate de infecções persistentes, quando se compara ao uso dos antimicrobianos isoladamente. Esta combinação quando utilizada de forma cautelosa e correta pode não só combater a resistência, mas também reverter o quadro do paciente (ZIMMERMANN; LEHAR; KEITH et al., 2007; HILL; COWEN, 2015).

As estratégias de fármacos combinados incluem: retardar ou prevenir o desenvolvimento da resistência, associação entre antibióticos e inibidor de enzimas de resistência (β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases serina) e também alterar as mutações com interações medicamentosas. Vale salientar que a combinação entre drogas que possuem resultados sinérgicos favorece a diminuição da dose com consequente redução de toxicidade (KING et al., 2014; WOOD et al., 2014; CHEVEREAU; BOLLENBACH, 2015; BAYM; STONE; KISHONY, 2016).

Sanguinetti et al (2019) relataram em seu estudo a importância do pronto atendimento em paciência com IFIs, ressaltando o impulso desta prática nos últimos anos. Neste documento os autores apresentam técnicas de imagens por tomografia por emissão de pósitrons para análise de órgãos possivelmente infectados, como o cérebro, pulmão e os rins.

2.6 Influência dos antibióticos sobre a microbiota

Define-se microbiota como uma gama de microrganismo presente no organismo com habilidade de proteger o hospedeiro no processo saúde-doença. A exemplo, podemos ressaltar que os microrganismos presentes na microbiota do trato gastrointestinal humano agem de forma protetora impedindo que outros patógenos colonizem aquele local e posteriormente ocasionem infecções (KIM; COVINGTON; PRAMER, 2017). A microbiota intestinal humana e animal é responsável por desempenhar funções no sistema nervoso central (SNC), controlando emoções e funções cerebrais (FOSTER; NEUFELD, 2013) e no Trato gastrointestinal mediante a ingestão nutricional (ALCOK; MALEY; AKTIPIIS, 2014). No entanto, alterações sofridas neste meio podem interferir de forma

direta no comportamento do indivíduo, como a utilização de altas doses de antibióticos (FOND et al., 2015; ANDERSON et al., 2020).

Os antibacterianos são fármacos utilizados para o tratamento de afecções ocasionadas por bactérias Gram positivas, Gram negativas e Micobactérias. Possuem diversas classes e são escalados após a análise clínica, anamnese e indicação médica. Contudo, nas últimas décadas tem-se relatado sobre o uso exacerbado/incorrecto dos antibióticos, que além da resistência microbiana (figura 5), podem conferir efeitos tóxicos e indesejáveis em seus usuários (GILBERT, 2003; ZHANG et al., 2013; ISAAC et al., 2016).

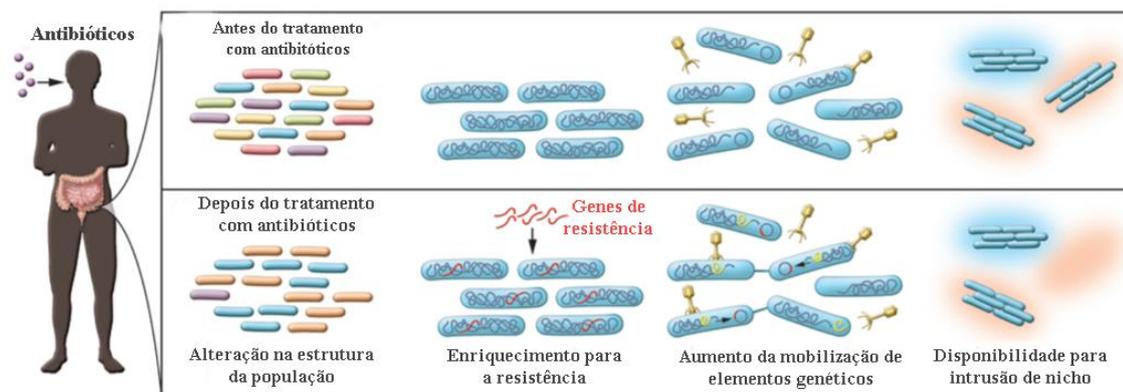


Figura 5. Efeitos de antibióticos em toda a comunidade microbiana na microbiota intestinal humana. O tratamento com antibióticos altera a estrutura populacional do microbiota endógena, reduzindo a diversidade bacteriana e redistribuindo a composição dos membros em efeitos transitórios e persistentes. Os antibióticos também selecionam membros da comunidade resistentes a antibióticos, enriquecendo a presença de genes de resistência no microbioma. O tratamento com antibióticos promove a transferência de informações genéticas entre as bactérias, aumentando a conjugação, a transdução de fago e a mobilidade do plasmídeo, principalmente por meio da ativação de respostas de estresse celular. Fonte: Modi e colaboradores (2014).

Neste contexto, sabe-se que a utilização dos antimicrobianos de amplo espectro na prática clínica podem alterar a mucosa do indivíduo, favorecendo o oportunismo de microrganismos, em destaque os fungos, que colonizavam aquele local de forma comensal e por hora agem de forma maléfica. No que diz respeito aos patógenos fúngicos, este fato, dar-se devido a capacidade *Candida* spp. e *Trichosporon* spp. possuem em causar disbiose do organismo, após estímulos, (como o uso de antibióticos) com posterior alteração de microbiota, propiciando o aparecimento de IFIs (SAMONIS et al., 2013).

Cordeiro et al. (2018; 2019) estudaram a influência dos antibióticos *in vitro* com espécies de *Candida* e mostraram que antibióticos β -lactâmicos e o glicopeptídeo vancomicina possuem atividade estimulatório frente a este patógeno, dentre outros estudiosos que também reportaram sobre a influência dos antimicrobianos frente a cepas de *Candida* spp (SIDRIM et al., 2015). Sousa (2018) evidenciou a ação de vancomicina frente a cepas de *Trichosporon* spp., contudo, pouco se sabe sobre mecanismos e virulência que os antibióticos, destacando a vancomicina, possui sobre a virulência e morfologia das colônias de espécies de *Trichosporon*.

Candida spp., colonizam de forma comensal alguns sítios anatômicos do corpo humano. São encontradas em um percentual de 20 a 80% no trato gastrointestinal de adultos e estima-se que pelo menos 30% esteja colonizando a região genital feminina. Contudo, devido a alterações fisiológicas do próprio organismo (devido ao uso abusivo de antimicrobianos, doenças crônicas, neutropenia, imunodeficiência) rompimento de barreiras anatômicas, a realização de procedimentos médicos invasivos e queimaduras, este microrganismo uma vez comensal, pode tornar-se patogênico, tendo em visto que estes fatores já descritos alteram o funcionamento do organismo tornando o hospedeiro susceptível (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; ANAISSIE; MCGINNIS; PFALLER, 2003).

Schulfer et al (2018) relatou sobre a exposição de antibióticos em crianças e sua associação com os possíveis desenvolvimento de doença inflamatória intestinal, e também, que essa alteração poderia passar da mãe para o filho. Com isso, os autores realizam um ensaio com camudongas prenhas e causaram a desordem de sua microbiota com a exposição a antibióticos. Ao final, detectaram que camundongos fêmeas com a microbiota afetada por antibióticos desenvolveu colite. Guida e seus colaboradores (2018) também estudaram o efeito que os antibióticos causam na microbiota intestinal. Os pesquisadores expuseram camundongos a uma mistura de ampicilina, estreptomina e clindamicina durante 2 semanas e após esse período, os animais apresentaram inflamação generalidade da mucosa, como também, alterações comportamentais que lhes geraram imobilidade da cauda.

Em humanos, Maraki e colaboradores (2003) mostraram em sua análise que houve a proliferação fúngica de *Candida* spp., no lúmen intestinal, orofaringe e vagina após o

tratamento dos pacientes com doxiciclina e/ou metronidazol, quando comparado ao grupo controle deste estudo.

2.7 Vancomicina

A vancomicina é um antibiótico da classe dos glicopeptídeos, possui uma cadeia tricíclica (figura 6) com 1500 daltons de massa molecular, aproximadamente. Foi descrita a primeira vez no ano de 1956, após ser isolada do solo em locais da Indonésia e Índia. É produzida pelo processo de fermentação da bactéria *Amycolatopsis orientalis* (TERRA; SILVA, 2017).

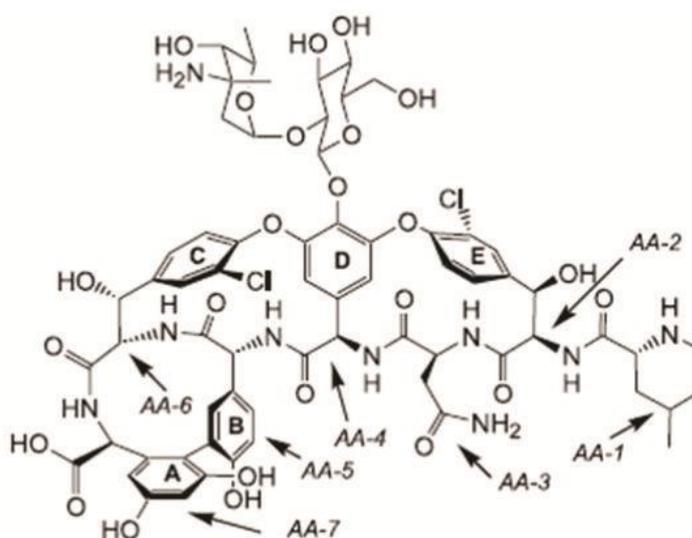


Figura 6: Representação estrutural do antibiótico glicopeptídico vancomicina, destacando os sete aminoácidos AA-1,..., AA-7 e os cinco anéis aromáticos A, B, C, D, E presentes.

Possui ação comprovada contra bactérias Gram positivas, principalmente para o tratamento de *Staphylococcus aureus* multirresistente (WRIGHT; WALSH, 1992). A administração oral de vancomicina não é comumente utilizada na prática médica devido a seu grau de toxicidade, entretanto é a segunda escolha para o tratamento dos casos de colite pseudomembranosa por *Clostridioides difficile*. Por via intravenosa por causar irritabilidade ou lesão por extravasamento acidental (ZAR et al., 2007; JOHNSON et al., 2012). Devido a efeitos como a nefrotoxicidade e ototoxicidade, a utilização de vancomicina passou a ser menos comum e substituída após o surgimento de penicilinas semissintéticas, sendo estas menos tóxicas. (LEVINE, 2006; SILVA e SILVA-JÚNIOR,

2015). A partir da década de 80 passou-se a optar pela vancomicina devido as constantes e crescente número de infecções ocasionadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (STRYJEWSKI e COREY, 2014).

Efeitos teratogênicos devido ao uso de vancomicina (embriotoxicidade e má formação) já foram comprovados em testes com animais. Para as puérperas, devem entrar em consenso com o médico responsável, pois a vancomicina pode ser excretada pelo leite materno (TERRA; SILVA, 2017).

Seu mecanismo de ação bactericida acontece por meio da inibição da síntese da parede celular das bactérias, com o bloqueio da síntese de peptidoglicano. Isto acontece por meio da ligação da vancomicina a porção terminal D-alanina-D-alanina das moléculas de peptidoglicano, o que detêm a interação entre as moléculas, não ocorrendo a síntese da parede (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

De acordo com Hicks e Hernandez (2011) a vancomicina não possui efeito contra bactérias Gram negativas e Micobactérias. Os microrganismos susceptíveis a ação da droga são: *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., (Anaeróbios Gram positivos), Difteroides, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalatae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (Aeróbios Gram positivos).

Isaac et al (2016) detectou que a vancomicina ocasiona sérios danos e mudanças consideráveis na microbiota intestinal humana. Notou-se que os pacientes que receberam o tratamento a longo prazo com vancomicina obtiveram alterações em sua microbiota, o que favorece a proliferação de patógenos resistentes a antibióticos, como *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (LEWIS et al., 2015). Liu et al. (2020) mostrou em seu estudo através de um simulador de ecossistema microbiano intestinal humano, que o tratamento com a vancomicina tornou propício o aumento das vias ligadas à doenças humanas, aumento dos genes de resistência aos antibióticos e tornou abundante o aparecimento de patógenos oportunistas como *Pseudomonas* spp. e *Klebsiella* spp.

3. HIPÓTESES

- ✓ A vancomicina aumenta a atividade metabólica de células planctônicas de *Trichosporon* spp.
- ✓ A vancomicina estimula a atividade metabólica e produção de biomassa em biofilmes de *Trichosporon* spp.
- ✓ A vancomicina possui influência na virulência de *Trichosporon* spp.
- ✓ A vancomicina aumenta a produção de células persistentes em biofilmes de *Trichosporon* spp.
- ✓ A vancomicina aumenta a tolerância de células persistentes a Anfotericina B
- ✓ A vancomicina altera a morfologia e a ultraestrutura das células sésseis de *Trichosporon* spp.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade da vancomicina frente ao crescimento e virulência de células planctônicas e sésseis de *Trichosporon* spp.

4.2 Objetivos Específicos

- Averiguar o crescimento da atividade metabólica de células planctônicas de *Trichosporon* spp. expostos à vancomicina.
- Constatar a taxa de crescimento metabólico e de biomassa dos biofilmes de *Trichosporon* spp. expostos à vancomicina.
- Averiguar a influência da vancomicina sobre a virulência de *Trichosporon* spp. frente à vancomicina
- Mostrar quantitativamente que biofilmes de *Trichosporon* spp. quando expostos à vancomicina são estimulados à produção de células persistentes.
- Verificar a responsividade das células persistentes cultivadas com vancomicina
- Examinar a morfologia e ultraestrutura das células sésseis de *Trichosporon* spp.

5. METODOLOGIA

5.1 Local do Estudo

O presente estudo foi realizado no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). A morfologia dos biofilmes foi analisada por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) na Central Analítica pertencente ao Departamento de Física da UFC.

5.2 Microrganismos

Foram analisados doze isolados clínicos de *Trichosporon* spp., sendo 6 de *T. asahii* e 6 de *T. inkin*, representados na tabela abaixo (tabela 1) com características de identificação e sítio isolado. As cepas estão disponíveis na coleção de cultura do CEMM da UFC. Para posterior início dos experimentos, a recuperação dos isolados contidos no estoque da micoteca do CEMM foi feita mediante repiques em Ágar Batata dextrose (Himedia®, Brasil) com incubação à 35° por 48h para todos os experimentos.

Os microrganismos foram identificados por meio de testes bioquímicos, como a capacidade de utilizar ureia como fonte de nutrição (teste de urease), assimilação de carboidratos e identificação micromorfológica em Ágar Malte (Himedia®, Brasil) (DE HOOG et al., 2000). De forma adicional, foram realizadas análises moleculares de sequenciamento da região IG1 do DNA ribossomal (rDNA), com os *primers* 26SF e 5SR (MESSIAS SILVESTRE et al., 2010). *Staphylococcus aureus* ATCC 20213 foi utilizado para validação da Vancomicina (VAN), *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas para a validação dos antifúngicos.

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

Cepas	Espécie fúngica	Origem de isolamento
CEMM 05-6-074	<i>Trichosporon inkin</i>	Urina
CEMM 05-6-075	<i>Trichosporon inkin</i>	Área Perineal
CEMM 01-1-144	<i>Trichosporon inkin</i>	Superficial
CEMM 01-1-143	<i>Trichosporon inkin</i>	Superficial
CEMM 01-1-145	<i>Trichosporon inkin</i>	Urina
CEMM 03-1-073	<i>Trichosporon inkin</i>	Unha humana
CEMM 05-6-072	<i>Trichosporon asahii</i>	Urina
CEMM 05-6-073	<i>Trichosporon asahii</i>	Cateter
CEMM 03-1-072	<i>Trichosporon asahii</i>	Sangue Humano
80	<i>Trichosporon asahii</i>	Aspirado traqueal
81	<i>Trichosporon asahii</i>	Sangue
82	<i>Trichosporon asahii</i>	Escamas ungueais
ATCC 6258	<i>Candida krusei</i>	Escarro
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	Fezes
ATCC 20213	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ferida

Legenda: CEMM= Centro Especializado em Micologia Médica; ATCC=*American Type Culture Collection*

5.3 Drogas utilizadas

O antibacteriano Vancomicina (VAN - Sigma-Aldrich, EUA) e o antifúngico Anfotericina B (AMB – Sigma, EUA) foram utilizadas nos ensaios. A VAN foi diluída de acordo com a recomendação do fabricante, em água destilada estéril; AMB em dimetilsulfóxido (DMSO) 100% armazenadas por congelamento na condição de -20°C, seguindo o preconizado pelo documento M27 – A3 do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

No momento do uso de cada experimento VAN e AMB foram diluídos em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 tamponado em ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS- Sigma, St. Louis) ajustado em pH de 7,0. As concentrações utilizadas nos testes foram: VAN na metade do pico plasmático (PP/2) de 15 µg/mL e no pico plasmático (PP) de 30 µg/mL (SOUSA, 2018) para os testes de biofilme e sensibilidade e para os outros ensaios apenas na concentração do PP (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012) e AMB em concentrações variadas a depender do experimento.

Desenho experimental

O trabalho dividiu-se em duas fases (figura 7). A primeira buscou avaliar o efeito da VAN sob as formas planctônicas de *Trichosporon* spp., e a segunda etapa, com células em biofilme, visualizando de forma estrutural a morfologia dessas células.

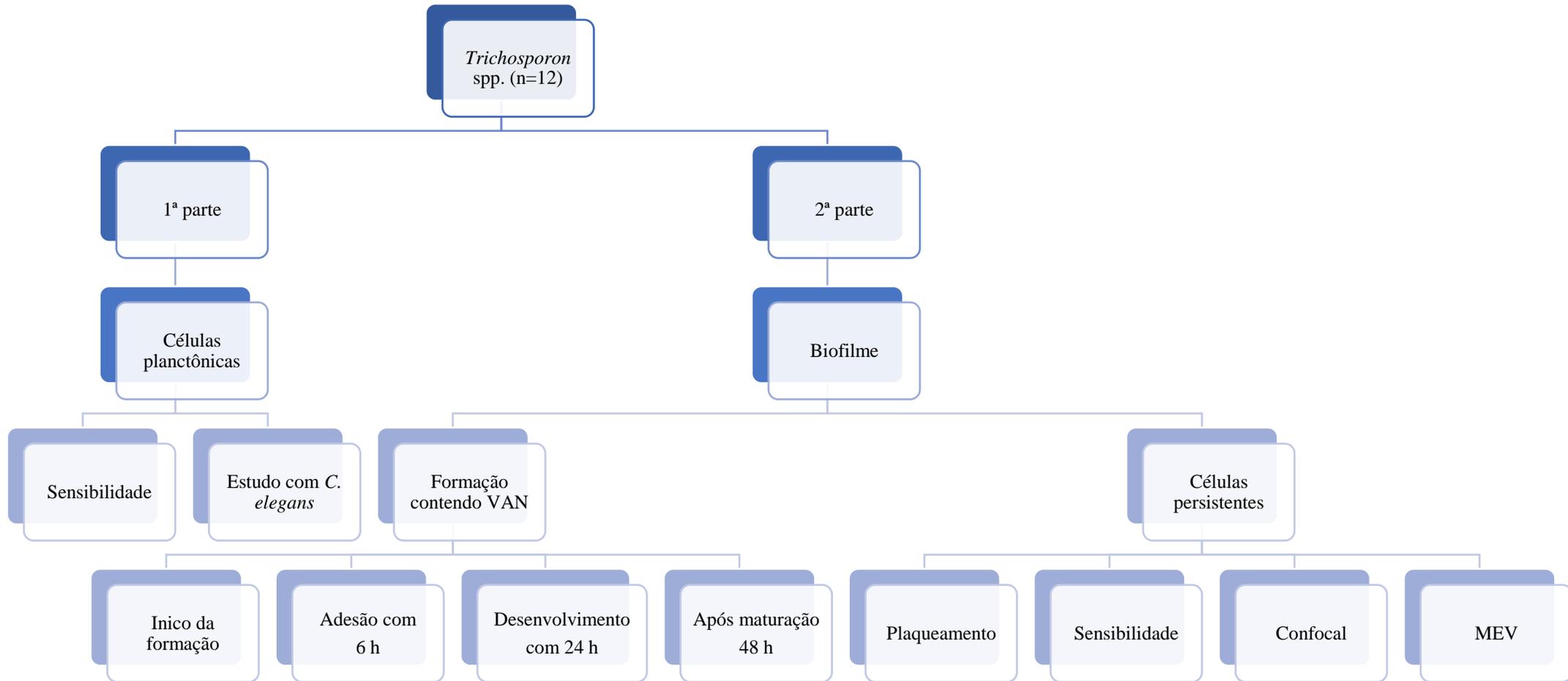


Figura 7. Organograma representativo das etapas metodológicas deste estudo.

PARTE EXPERIMENTAL 1

5.4 Sensibilidade de células planctônicas

O perfil de sensibilidade no crescimento planctônico foi avaliado por 12 isolados clínicos de *Trichosporon* spp. (6 cepas de *T. inkin* e 6 cepas de *T. asahii*) e determinado pela técnica de microdiluição em caldo como descrito no documento M27-A3 publicado pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os isolados foram previamente repicados em Ágar batata dextrose (Himedia®, Brasil) e incubadas à 35°C por 48h. Para a obtenção do inóculo, as colônias obtidas a partir do repique foram diluídas primeiramente em salina, ajustadas na escala 0,5 de McFarland e posteriormente diluídas de 1/50 seguido por 1/20 em meio RPMI 1640. A VAN foi a droga utilizada nessa análise em concentrações fixas de 15 µg/mL (PP/2) e 30 µg/mL (PP) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Foram adicionados 100µL do inóculo mais 100µL da droga em RPMI nas respectivas concentrações. Para o controle de crescimento, 100µL do inóculo e 100µL de RPMI. Controles livres de droga foram adicionados ao teste como parâmetro de comparação. Em seguida, a placa foi incubada à 35°C por 48h.

Para complementar a análise referente ao perfil de sensibilidade planctônica, as células foram analisadas pela metodologia do sal tretazólico 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H- hidróxido de tetrazólio (XTT) segundo Martinez e Casadevall, (2006), com adaptações. Após o período de incubação, os poços foram homogeneizados e a placa foi centrifugada à 4000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, o sobrenadante foi retirado, adicionou-se 200µL de tampão fosfato salina (PBS), foi homogeneizado, centrifugado novamente nas mesmas condições e a solução foi descartada adicionando-se 120µL da solução do teste de redução por XTT, composta: por 131 µL de solução de XTT, 50 µL de PBS estéril, 75 µL de solução de XTT (1 mg/mL em PBS) e 6 µL de solução de menadiona (1 mM em acetona, Sigma) e incubado à 35°C por um período de 3 horas. Posteriormente, a placa foi centrifugada, a solução foi transferida para outra placa e realizada leitura por espectrofotometria em um comprimento de onda de 492nm. O experimento foi realizado em triplicada para cada condição.

5.5 Ensaio com *Caenorhabditis elegans*

O efeito do antibiótico vancomicina em relação a virulência de *Trichosporon* spp. foi analisado frente ao modelo de infecção utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans* a partir da metodologia proposta por Cordeiro et al. (2015a), com adaptações advindas do protocolo original de Breger et al., (2007). Foram utilizadas duas cepas representativas do patógeno (por serem as melhores formadoras de biofilme), sendo uma de cada espécie *Trichosporon inkin* (CEMM 05-6-074) e *Trichosporon asahii* (CEMM 05-6-072). Os vermes em estágio L4 foram cultivados previamente em meio de cultivo NGM (*Nematode Growth Medium*) na presença de *Escherichia coli* OP50. As cepas fúngicas foram repicadas em duas condições: em ágar RPMI acrescido de VAN na concentração do seu pico plasmático e em ágar RPMI sem a adição da droga, ambos, durante 48 h. Decorrido esse tempo, os nematódeos foram transferidos do meio inicial NGM mediante ao processo de lavagem com tampão M9 (3g KH₂PO₄, 6g Na₂HPO₄, 0,5g NaCl e 1g NH₄Cl), para as placas que continham o microrganismo repicado em contato com a droga e sem a droga. As placas foram incubadas à 25°C durante 2h, tempo necessário para que os vermes se alimentassem do microrganismo em questão. Em seguida, os vermes foram lavados com tampão M9 duas vezes e uma vez com caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) para a retirada dos microrganismos aderidos. Após esse processo, cerca de 50 vermes foram transferidos para placas de petri que continha o meio líquido composto por 79% de tampão M9, 20% de caldo BHI, 10 µg/mL de colesterol diluído em etanol e VAN em 30 µg/mL, tanto para *E. coli* quanto para uma das condições com *Trichosporon* spp. Essas placas foram incubadas durante cinco dias a 25°C. Durante esse período, os nematódeos foram analisados no que se diz respeito a sua viabilidade com a utilização de um estereomicroscópio em tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h. Nesse processo de contagem e avaliação, foram quantificados os vermes mortos, sendo considerados aqueles que apresentaram as estruturas fúngicas saindo do pseudoceloma do nematódeo e/ou não apresentaram motilidade após estímulos mecânicos. Os mortos foram retirados das placas com o auxílio de ponteiras estéreis ao longo do experimento e ao final foi estabelecida uma curva de sobrevivência (BREGGER et al., 2007).

PARTE EXPERIMENTAL 2

5.6 Formação dos Biofilmes

A formação dos biofilmes foi feita como descrito por Cordeiro et al (2015) com adaptações, em placas de poliestireno de microdiluição com 96 cavidades de fundo “chato”. As alíquotas para obtenção dos inóculos foram preparadas a partir de repiques prévios de 48 h em Ágar Batata Dextrose com incubação de 35°C. Os inóculos foram diluídos em caldo RPMI 1640, ajustados à escala 0,5 de McFarland, equivalente a $2,5 \times 10^6$ cels/mL. Em todas as análises, a VAN foi adicionada na concentração de PP/2 (15 µg/mL), PP (30 µg/mL) e poços sem a adição da VAN como parâmetros de controle. Ao fim de cada teste, os biofilmes nas suas receptivas condições foram submetidos aos testes de XTT como descrito no item 5.4. e cristal violeta. Todos os experimentos foram feitos em triplicata para cada condição.

5.7 Formação dos Biofilmes em diferentes tempos de adição da Vancomicina

Foram utilizadas 12 cepas da micoteca do CEMM, *T. asahii* (n=6) e *T. inkin* (n=6). Para tanto, a VAN foi adicionada no biofilme em etapas diferentes do seu período de formação: Início da formação do biofilme, adesão celular com 6 h, desenvolvimento com 24 h, biofilme maduro com 48 h.

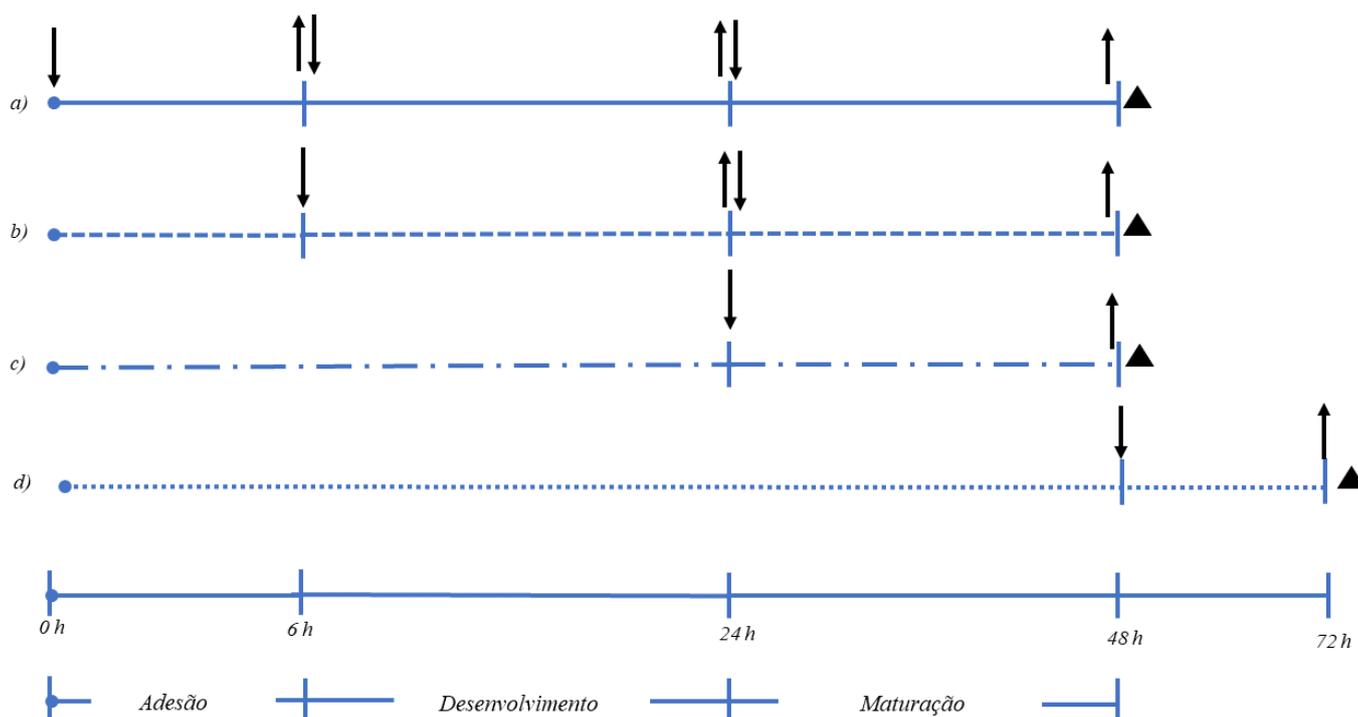


Figura 8. Esquemática dos experimentos com biofilmes de *Trichosporon* spp.

↓ indicam a adição da VAN ↑ indicam a remoção da VAN

▲ indicam as análises por XTT e Cristal Violeta.

Os experimentos estão divididos em: Início da formação do biofilme (a), adesão celular com 6 h (b), desenvolvimento com 24 h (c) e biofilme maduro com 48 h (d).

5.7.1 a) Efeito da VAN sobre o início da formação dos biofilmes

Inicialmente, foram adicionados 100µL do inóculo em RPMI na placa e 100µL de RPMI acrescido de VAN na concentração PP/2 a 15 µg/mL e PP a 30 µg/mL e somente RPMI também como controle, a placa foi incubada à 35°C por 6h. Em seguida, foram retiradas as alíquotas dos poços, realizado lavagem com solução salina 0,9%, adicionado 200µl de RPMI com VAN na concentração de PP/2 e PP, a placa foi incubada a 35°C até completar 24 horas. Posteriormente, foi realizada lavagem, adicionado VAN na concentração de PP/2 e PP e incubado por mais 24 horas a 35°C. Após a maturação do biofilme ele foi submetido aos testes de XTT (item 5.4) e Cristal violeta, onde os biofilmes foram expostos a 200µL de metanol 100% (Dinamica, Brasil) durante 5 minutos para cada poço, 200 µL do corante cristal violeta a 0,3% durante 30 minutos, posteriormente foram realizadas lavagens com 200 µL de água destilada para cada poço, adicionou-se 200 µL de ácido acético a 33% para que os biofilmes fossem descorados e posteriormente a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 540nm. (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; PEETERS, NELIS e COENYE, 2008).

5.7.2 b) Efeito da VAN sobre a adesão com (6h)

Foram transferidas para a placa de 96 poços, 100µl da solução do inóculo e 100µl de RPMI. A placa foi incubada à 35°C por 6h. Após o período de adesão celular, os poços foram lavados com salina estéril e as células não aderidas foram removidas, adicionado VAN na concentração de PP/2 e PP, poços somente com RPMI e a placa foi incubada a 35°C até completar 24 horas. Posteriormente o biofilme foi submetido novamente ao processo de lavagem e adicionado mais 200µl de RPMI contendo a VAN no PP/2 e PP, incubando-se a placa até 48h para a completa maturação do biofilme. Após esse processo, o biofilme foi lavado e submetido aos testes de XTT (item 5.4) e Cristal Violeta (item 5.7.1) (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; PEETERS, NELIS e COENYE, 2008).

5.7.3 c) Efeito da VAN sobre o desenvolvimento do biofilme (24h)

Foram adicionadas à placa de 96 micro poços 100µL do inóculo e 100µL de RPMI que foi incubada à 35°C por um período de 6h. Em seguida, a alíquota foi aspirada e desprezada, as células aderidas foram lavadas, adicionando-se 200µl de VAN em RPMI e incubou-se a placa à 35°C durante 24 h. Posteriormente, o conteúdo dos poços foi retirado, lavando-se os poços, sendo adicionado a placa 200µl de VAN no PP/2 e PP em

RPMI e a placa foi incubada até que cumprisse o tempo de maturação de 48 h, à 35°C. Chegada às 48h de cultivo do biofilme, a solução adicionada anteriormente foi retirada e o biofilme foi lavado e submetido aos processos de XTT (viabilidade metabólica como descrito no item 5.4) e Cristal Violeta (biomassa, descrita no item 5.7.1) (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; PEETERS, NELIS e COENYE, 2008).

5.7.4 d) Efeito da VAN sobre o biofilme maduro (48 h)

Após sua maturação, os conteúdos dos poços foram desprezados, os biofilmes foram lavados com salina 0,9% e houve adição de 200µL de RPMI acrescido de VAN em PP/2 e PP. A placa foi incubada por 24h à 35°C. Em seguida, a placa foi lavada e por fim os biofilmes foram analisados pela metodologia do XTT (item 5.4) e Cristal Violeta (item 5.7.1) para avaliação da atividade metabólica e biomassa deste biofilme, respectivamente (CORDEIRO et al., 2015).

5.8 Plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

A formação dos biofilmes foi baseada na metodologia exposta por Cordeiro et al (2015), com adaptações e realizada da mesma forma como relatada anteriormente. Utilizou-se 12 cepas de *Trichosporon*, *T. asahii* (n=6) e *T. inkin* (n=6). Desde a adesão até sua maturação o biofilme foi cultivado com VAN em sua concentração do pico plasmático (30 µg/mL) e poços controle sem a adição do antibiótico foram incluídos no teste. Após o período de maturação de 48 horas, o biofilme foi lavado com salina 0,9% e em seguida adicionou-se AMB na concentração de 100 µg/mL e poços sem adição do antifúngico. A placa foi incubada por 24 horas em estufa de 35°C. Os poços foram lavados com salina 0,9%, foram adicionados 200 µL de salina 0,9% em todos os poços e com o auxílio de uma ponteira p1000 estéril realizou-se a raspagem dos poços para a obtenção de todas as células que conseguiram sobreviver as diferentes concentrações de AMB, assim, consideradas as células persistentes daquele biofilme, de acordo com o processo metodológico de Lafleur, Kumamoto e Lewis (2006), com adaptações.

Após a raspagem dos poços, o conteúdo foi coletado, transferido para microtubos estéreis, prosseguindo-se com diluições seriadas em salina e, em seguida, foram plaqueados 100 µL da solução final em placas com ágar batata dextrose, seguido por incubação à 35°C por 48 horas até que fosse possível realizar a contagem do crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

5.9 Sensibilidade das células persistentes

A realização da sensibilidade de células persistentes foi executada após a formação do biofilme, baseada na metodologia de Cordeiro et al (2015) já descrita. Foram utilizadas 12 cepas da micoteca do CEMM, sendo 6 de *Trichosporon inkin* e 6 de *Trichosporon asahii*. AMB nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL foram adicionadas ao biofilme depois de maduro e a placa foi incubada por 24 horas à 35°C. Após esse tempo, o biofilme foi lavado com salina 0,9%, posteriormente salina 0,9% foi adicionada novamente aos poços, o qual foram raspados como já relatado. As alíquotas para o inóculo foram obtidas mediante o conteúdo restante do biofilme após a exposição da droga, dando início ao teste de sensibilidade das células persistentes.

Para realização do teste de sensibilidade das células persistentes, o inóculo foi ajustado primeiramente em solução salina 0,9% na escala 0,5 de McFarland, diluições de 1/50 e 1/20 foram realizadas após isso em meio RPMI 1640. O teste foi realizado em placa de poliestireno de 96 poços de fundo “U”. 100 µL de RPMI foram adicionados em toda a placa. AMB foi adicionada nos primeiros poços e diluída de forma seriada do primeiro poço até o poço 10, sendo a primeira concentração de 128 µg/mL e a última 0,25 µg/mL. 100 µL restantes dessa diluição foram adicionados ao poço 12, servindo este como controle de esterilidade do teste. Por fim, 100 µL do inóculo foram adicionados do poço 1 ao 11, sendo o poço 11 o controle de crescimento do ensaio. Foram incluídas nos testes as mesmas 12 cepas em sua forma planctônica. A placa foi incubada por 48 horas à 35°C. A leitura foi realizada de forma visual, considerando um índice de inibição de 100% para o antifúngico testado.

5.10 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

O efeito da VAN e da AMB sob a morfologia ultraestrutural dos biofilmes de *Trichosporon* spp. foi analisada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), como proposto por Di Bonaventura et al. (2006) e Cordeiro et al. (2015), com adaptações. A análise foi realizada com uma cepa de *Trichosporon inkin* (CEMM 05-6-074) e uma de *Trichosporon asahii* (CEMM 05-6-072) (sendo estas as melhores formadoras de biofilmes) e controles sem a adição das drogas foram incluídos no ensaio. Sem VAN, controle negativo e sem AMB controle de crescimento.

O biofilme foi cultivado com VAN desde seu período de adesão com 250µL de inóculo e 250µL de VAN em meio RPMI na escala 0,5 de MCFarland. O processo de análise deu-se início após a maturação do biofilme (48h) em lâminas de Thermanox® (Nunc Inc., EUA) depositada em placas de poliestireno de 12 poços. AMB foi adicionada na concentração de 100 µg/mL e incubada por 24 horas. A fixação dos biofilmes foi feita com Glutaraldeído a 2,5% contendo tampão cacodilato de sódio 0,15 M em pH de 7,4, 0,1% do corante azul de alcian e os biofilmes foram incubados por *overnight* a 4°C. Na sequência, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato 0,15 M e sofreram desidratações com álcool nas concentrações de 50%, 70%, 80%, 95% e 100%, respectivamente, durante 10 minutos cada, e duas vezes por cada concentração. Em seguida, os biofilmes foram desidratados com hexametildisilazano por 30 minutos e as lâminas de Thermanox® foram colocadas em um dessecador com sílica durante 24h. Para a análise foi necessário que as lâminas fossem recobertas com 10 nanômetros (Nm) de ouro pelo equipamento Emitech Q150T e a observação foi realizada por meio de um microscópio eletrônico de varredura especializado FEI Inspect S50, em vácuo de 15kV. As imagens visualizadas e obtidas foram processadas no *software Photoscape* v3.6.5 (MooiiTech, Korea).

5.11 Microscopia Confocal de Varredura a Laser - MCVL

A ação da VAN e da AMB para avaliar a viabilidade e a ultraestrutura dos biofilmes formados por *Trichosporon* spp., foi realizada por Microscopia Confocal de Varredura a Laser – MCVL, de acordo com Di Bonaventura e seus colaboradores (2006). Foi utilizada nesse estudo uma cepa de *T. inkin* (CEMM 05-6-074). Poços sem a adição das drogas foram incluídos no teste.

Os biofilmes foram formados em lâminas de Thermanox® (Nunc Inc., EUA), como descrito no item 5.10. Após a maturação do biofilme, foi adicionado AMB na concentração de 100 µg/mL. As lâminas contendo os biofilmes foram cobertas pelo corante fluorescente *Live/Dead* (Invitrogen, EUA) e analisadas pelo microscópio Nikon C2. Os comprimentos de ondas analisados foram: 488 nm para identificação do corante Syto9, evidenciando células viáveis coradas em verde e 561 nm para o corante iodeto de propídeo, identificando células inviáveis em vermelho. Para a seleção das imagens foram analisados cinco campos de cada amostra tridimensional do biofilme. Por fim, a

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

5.12 Análise estatística

A representação gráfica e análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). As variáveis foram comparadas pela análise de variância (ANOVA de uma via) com o teste de comparação múltipla post hoc de Tukey ou pelo teste t pareado, conforme apropriado. Para a curva de sobrevida, foram utilizados o teste de Kaplan-Meier, o teste de log-rank e o teste de Wilcoxon para detectar diferenças entre os grupos. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1 VAN estimula a atividade metabólica das células planctônicas

VAN, nas concentrações de PP e PP / 2, foi capaz de estimular a atividade metabólica de *T. inkin* e *T. asahii* (Figura 9). VAN na concentração de PP / 2 foi capaz de estimular o crescimento de 2/6 cepas de *T. inkin* e 3/6 cepas de *T. asahii*; na concentração de PP observou-se aumento da atividade metabólica em 5/6 cepas de *T. inkin* e 3/6 cepas de *T. asahii*.

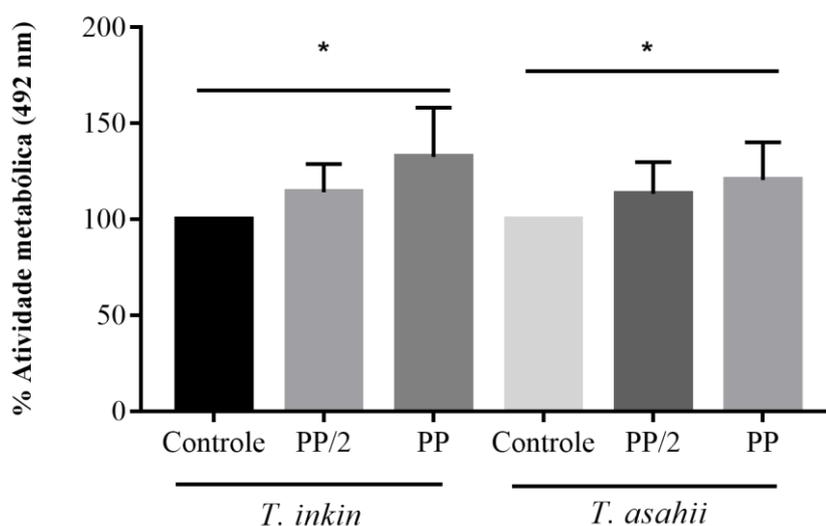


Figura 9. Efeito de VAN em células planctônicas de *T. asahii* (n = 6) e *T. inkin* (n = 6). As cepas foram cultivadas em meio RPMI suplementado com VAN em concentrações que correspondem ao pico plasmático da droga (PP) ou meio pico plasmático (PP / 2). A atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio de redução XTT. Os valores são apresentados como média \pm DP. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle livre de drogas (P < 0,05).

6.2 VAN influencia na virulência de *Trichosporon* spp.

VAN (PP) aumentou a virulência de *T. inkin* CEMM 05-6-074 e *T. asahii* CEMM 05-6-072 no modelo experimental de infecção com o nematóide *C. elegans* (Figura 10). As células de *Trichosporon* tratadas com VAN (*Trichosporon*-VAN) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a mortalidade de *C. elegans* a partir do segundo dia de infecção (*T. inkin*, 58% versus 38% no grupo de controle; *T. asahii*, 60% versus 32% no grupo de controle). A mortalidade completa dos vermes foi observada após três dias ou quatro dias após a infecção com *T. inkin*-VAN ou *T. asahii*-VAN, respectivamente. Aproximadamente 20% ou 48% dos vermes sobreviveram após cinco dias de infecção com *T. inkin* ou *T. asahii* cultivados sem VAN, respectivamente.

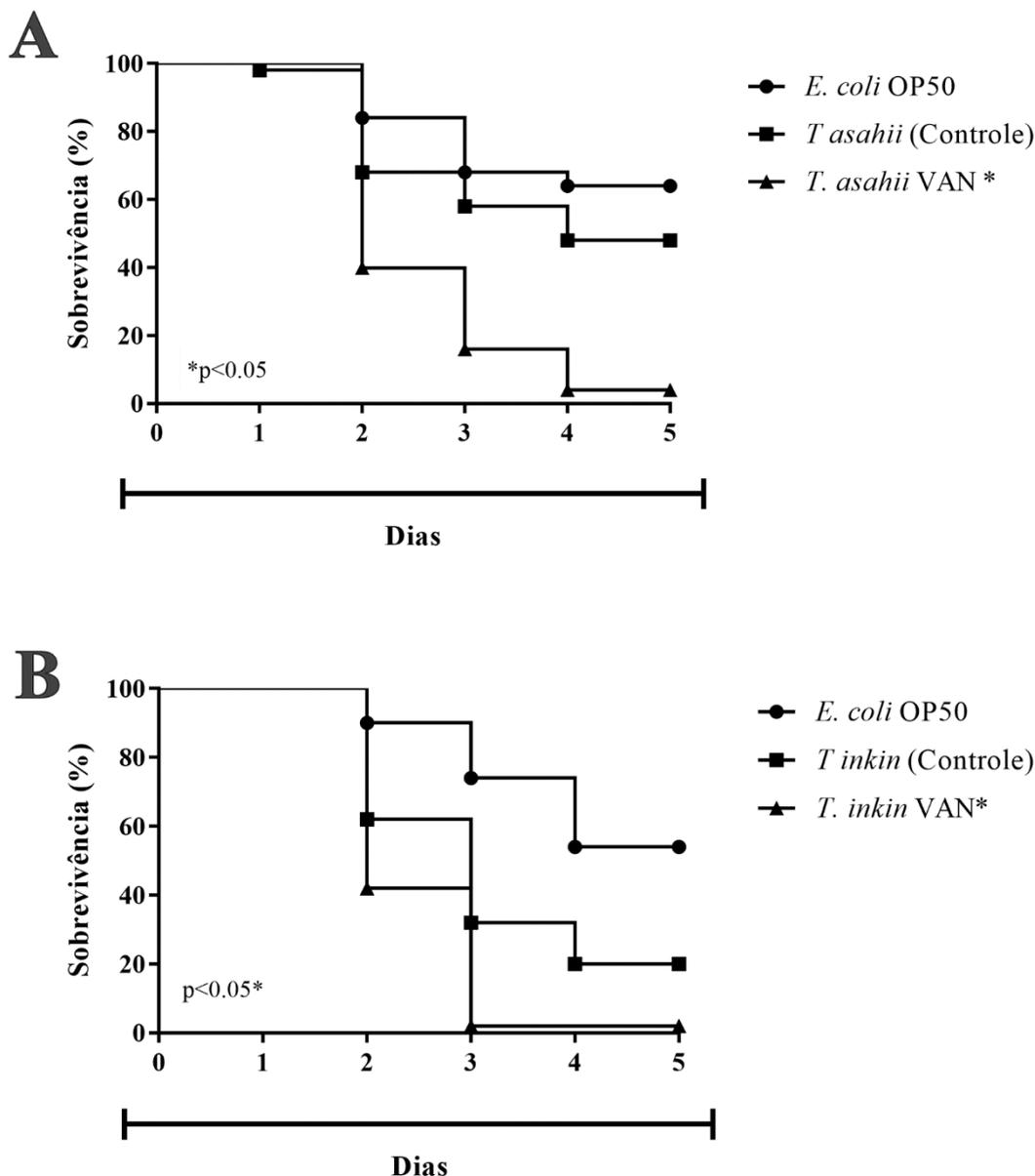


Figura 10. Efeito da vancomicina (VAN) na virulência *in vivo* de *T. inkin* CEMM 05-6-074 (10A) e *T. asahii* CEMM 05-6-072 (10B) no modelo de infecção por *C. elegans*. Os vermes foram autorizados a se alimentar por 2 h em *Trichosporon* spp. crescido com ou sem VAN na concentração de PP e, em seguida, transferido para meio líquido livre de patógenos na presença de VAN ou solução salina (controle). Os vermes mortos foram contados e removidos diariamente. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos de cada espécie ($p < 0,05$).

6.3 Efeito de VAN sobre atividade metabólica e biomassa de *T. inkin*

Observou-se que VAN foi capaz de alterar a atividade metabólica de biofilmes de *T. inkin*. (figura 11). Observa-se que o antibiótico aumentou a atividade metabólica em

todos os estágios do desenvolvimento do biofilme: durante 0h (1/6 cepas), após 6 h de adesão (3/6), após 24h de desenvolvimento (1/6) e após a maturação do biofilme (3/ 6 cepas). A VAN aumentou mais significativamente a produção de biomassa, conforme pode ser observado em biofilmes que receberam o antibiótico no tempo 0h de formação do biofilme (6/6 cepas), após 6h de adesão (6/6), após 24h de desenvolvimento (6/6) e após a maturação do biofilme (4/ 6 cepas).

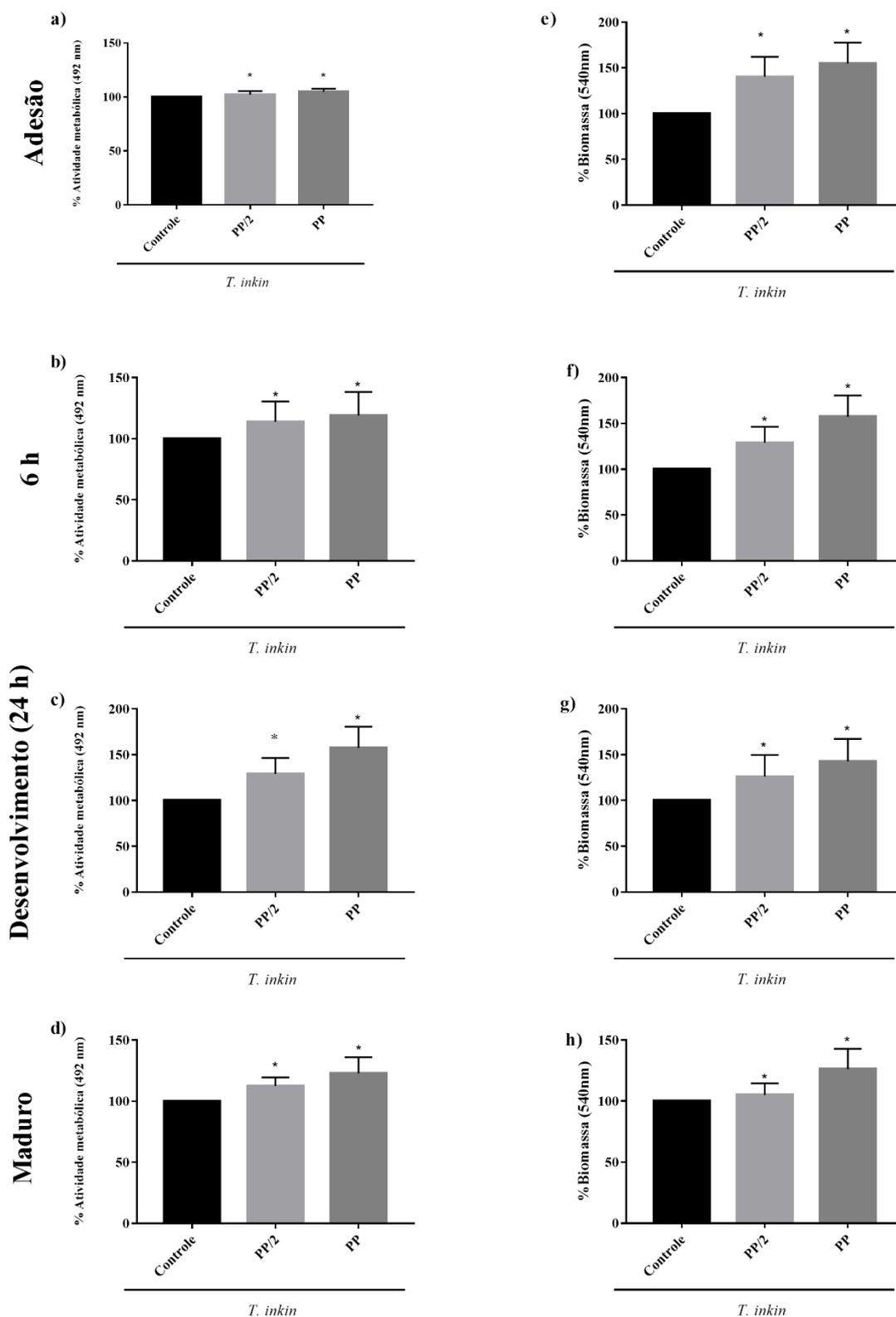


Figura 11. Efeito da VAN sobre a atividade metabólica (A, B, C e D) e biomassa (E, F, G e H) de biofilmes de *T. inkin* no tempo zero (A, E), adicionado após 6h de adesão (B, F), após 24h de desenvolvimento (E, G) e após a maturação de 48h (D, H).

6.4 Efeito de VAN sobre atividade metabólica e biomassa de *T. asahii*

Para *T. asahii*, VAN (PP e PP / 2) aumentou a atividade metabólica e biomassa quando adicionado no tempo zero (4/6 cepas e 6/6 cepas), após 6h de adesão (4/6 cepas), após 24h de desenvolvimento (5/6 cepas e 6/6 cepas), e após a maturação do biofilme (5/6 cepas). Representado na figura 12.

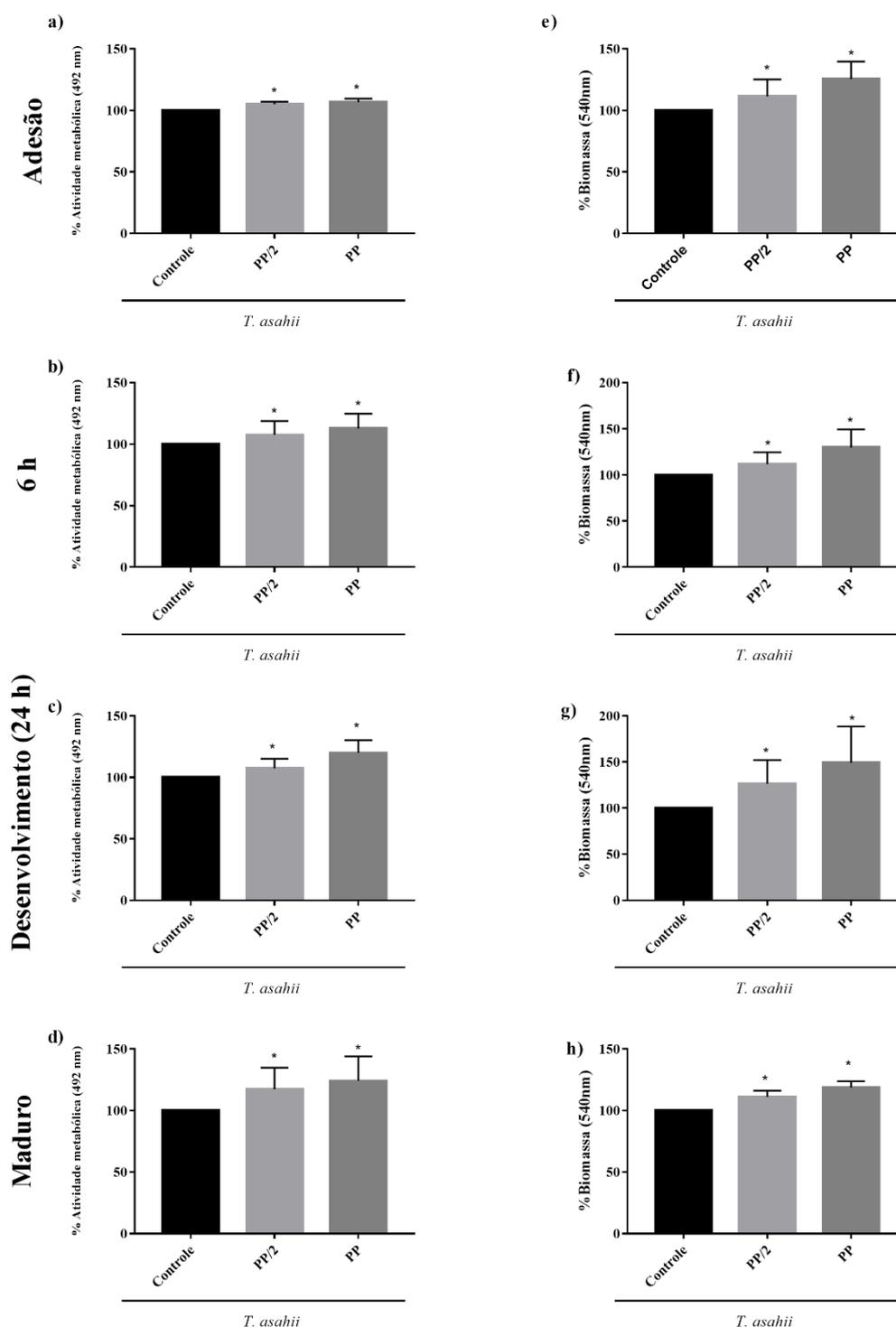


Figura 12. Efeito da VAN sobre a atividade metabólica (A, B, C e D) e biomassa (E, F, G e H) de biofilmes de *T. asahii* no tempo zero (A, E), adicionado após 6h de adesão (B, F), após 24h de desenvolvimento (E, G) e após a maturação de 48h (D, H).

6.5 VAN aumenta o número de células persistentes em biofilmes de *T. asahii* e

T. inkin

Observou-se aumento do número de células persistentes nos biofilmes formados em meio RPMI suplementado com VAN, quando comparados aos biofilmes formados em meio RPMI sem VAN (Figura 13). VAN (PP) estimulou um aumento no número de células persistentes em *T. inkin* (cepas 3/6) e *T. asahii* (cepas 5/6). Representados na figura 13.

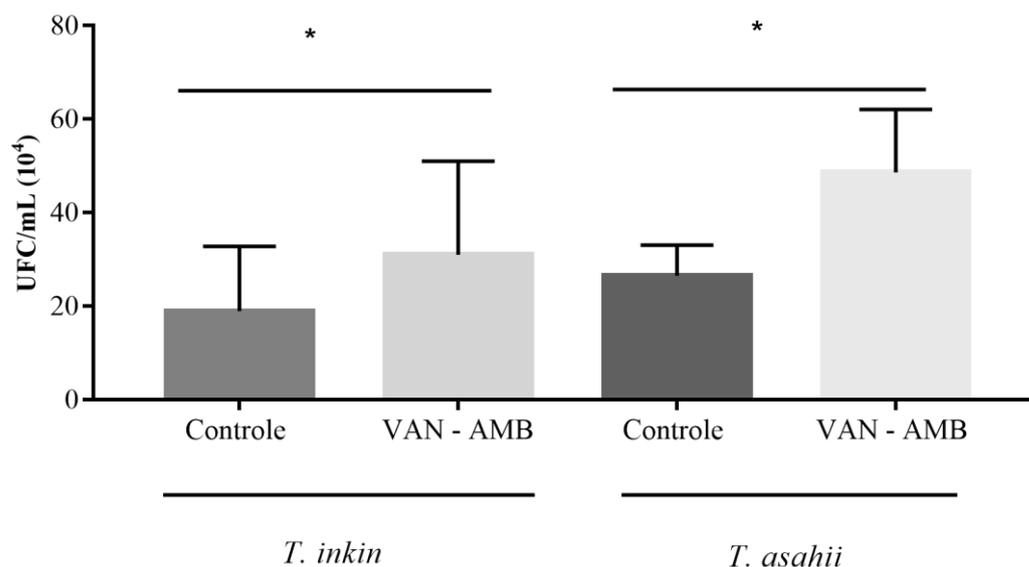


Figura 13. Efeito de VAN no número de células persistentes em biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii*. Os biofilmes foram formados em meio RPMI suplementado com VAN em concentração equivalente ao seu pico plasmático; Biofilmes maduros com 48 h foram então tratados com 100 µg / mL AMB (VAN-AMB). Biofilme controles foram formados em meio RPMI e após a maturação foram tratados com 100 µg / mL AMB. Os valores são apresentados como média ± DP. * Diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao respectivo controle livre de drogas (P < 0,05).

6.6 VAN aumenta a tolerância de células persistentes a *Trichosporon* spp.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) da anfotericina B (AMB) contra as cepas de *T. inkin* e *T. asahii* em diferentes condições de cultivo.

Espécies	Cepas	AMB (µg/ml)*						
		Células planctônicas ^a	Biofilme (controle) ^b	Biofilme (controle - VAN) ^c	Biofilme AMB 50 ^d	Biofilme AMB 50 - VAN ^e	Células persistentes (AMB100) ^f	Células persistentes VAN (AMB100) ^g
<i>T. inkin</i>	CEMM 05-6-074	1	16	32	32	64	64	128
	CEMM 01-1-145	0.5	32	64	32	64	128	>128
	CEMM 05-6-075	1	32	64	64	64	128	>128
	CEMM 01-1-143	0.5	16	64	64	128	> 128	>128
	CEMM 03-1-073	1	64	128	64	128	128	>128
	CEMM 01-1-144	0.5	32	64	64	128	128	128
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	0.5	32	64	64	64	128	>128
	CEMM 05-6-073	2	16	64	16	64	64	>128
	CEMM 03-1-072	1	32	32	32	64	128	128
	CEMM 80	0.25	64	128	128	> 128	> 128	>128
	CEMM 81	1	64	64	128	64	> 128	>128
	CEMM 82	0.5	32	64	128	128	128	>128

Legenda: a Células planctônicas cultivadas em RPMI sem vancomicina (VAN).

b Células desagregadas de biofilmes maduros (48h) formadas em RPMI.

c Células desagregadas de biofilmes maduros (48h) formadas em RPMI acrescido de VAN.

d Células desagregadas de biofilmes maduros (48h) formadas em RPMI e então suplementadas com anfotericina B (AMB) a $50\mu\text{g} / \text{mL}$.

e Células desagregadas de biofilmes maduros (48h) formadas em RPMI acrescido de VAN e então suplementadas com anfotericina B (AMB) a $50\mu\text{g} / \text{mL}$.

f Células persistentes de biofilmes maduros (48h) formados em RPMI suplementado com anfotericina B (AMB) a $100\mu\text{g} / \text{mL}$.

g Células persistentes de biofilmes maduros (48h) formados em RPMI acrescido de VAN e suplementado com anfotericina B (AMB) a $100\mu\text{g} / \text{mL}$.

6.7 Estrutura dos biofilmes

Em comparação com biofilmes de controle (Figuras 14A e 14B), foi visto que VAN (PP) aumentou a produção de matriz extracelular e células em biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii* por MEV (Figuras 14C e 14D). AMB (100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) interrompeu a estrutura tridimensional dos biofilmes, deixando poucas estruturas filamentosas preservadas (Figuras 14E e 14F). No entanto, os biofilmes formados com VAN e posteriormente tratados com AMB 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ apresentaram maior densidade celular (Figuras 14G e 14H).

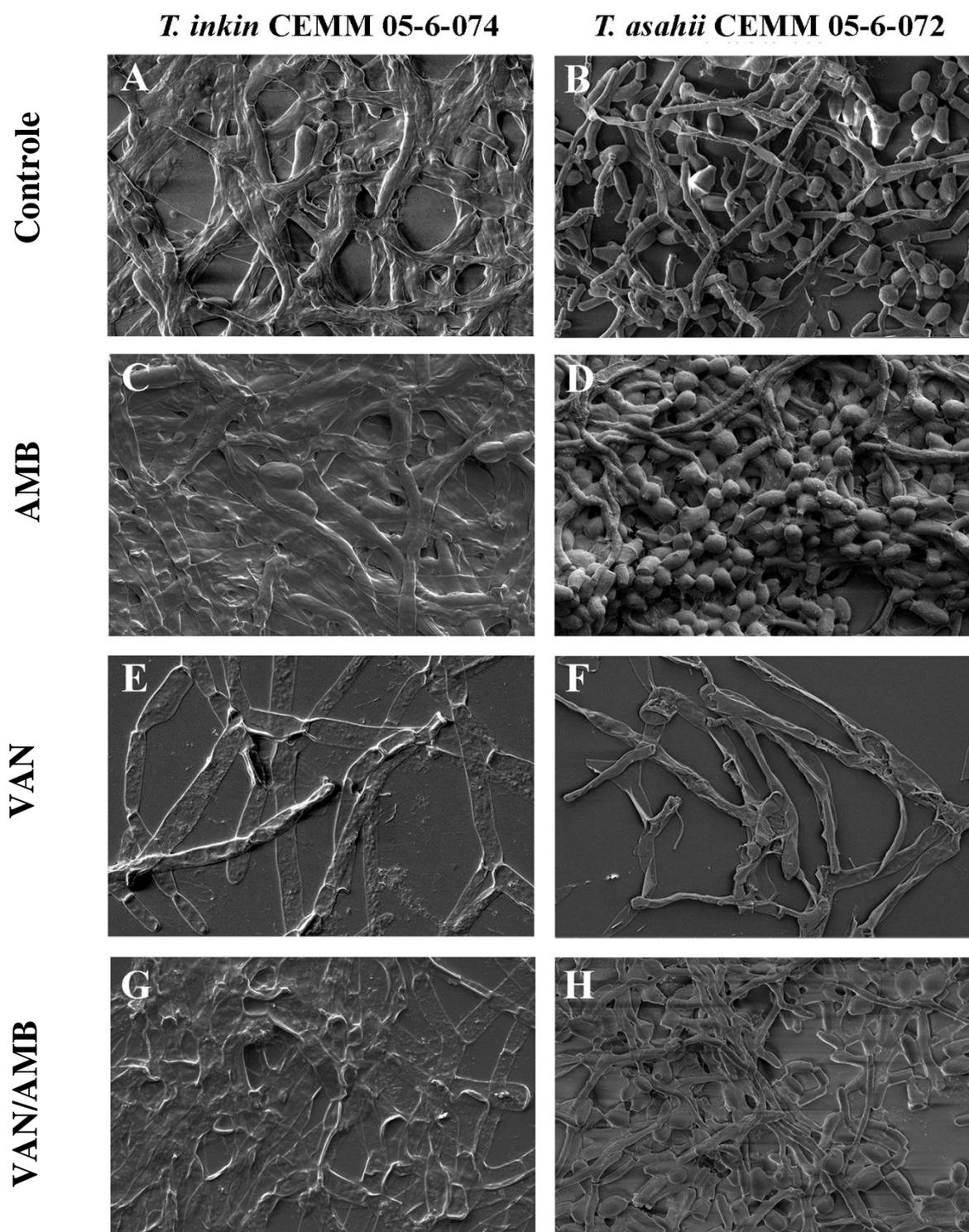


Figura 14. Ação da VAN frente a biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii*. Imagens ilustram biofilmes controle maduros cultivados sem VAN (A e B), biofilmes maduros cultivados com VAN (C e D), biofilmes maduros cultivados sem VAN e tratados com 100 µg/mL de AMB (E e F), e biofilmes maduros cultivados com VAN e tratados com 100 µg/mL de AMB (G e H). Aumento 5.000x.

A MCVL mostrou que em comparação com o biofilme controle (figura 15A), o biofilme cultivado com VAN (figura 15B) apresentou maior quantidade de células. Em seguida após a adição da AMB (figura 15C), restaram poucas células viáveis e houve uma redução da quantidade de estruturas no biofilme controle. Para tanto, o biofilme que foi cultivado com VAN, após a adição da AMB (figura 15D), manteve suas estruturas e células viáveis. Espessura: Controle 47.46 μ m; VAN 42.38 μ m; AMB 10.50 μ m; AMB/VAN 39.10 μ m.

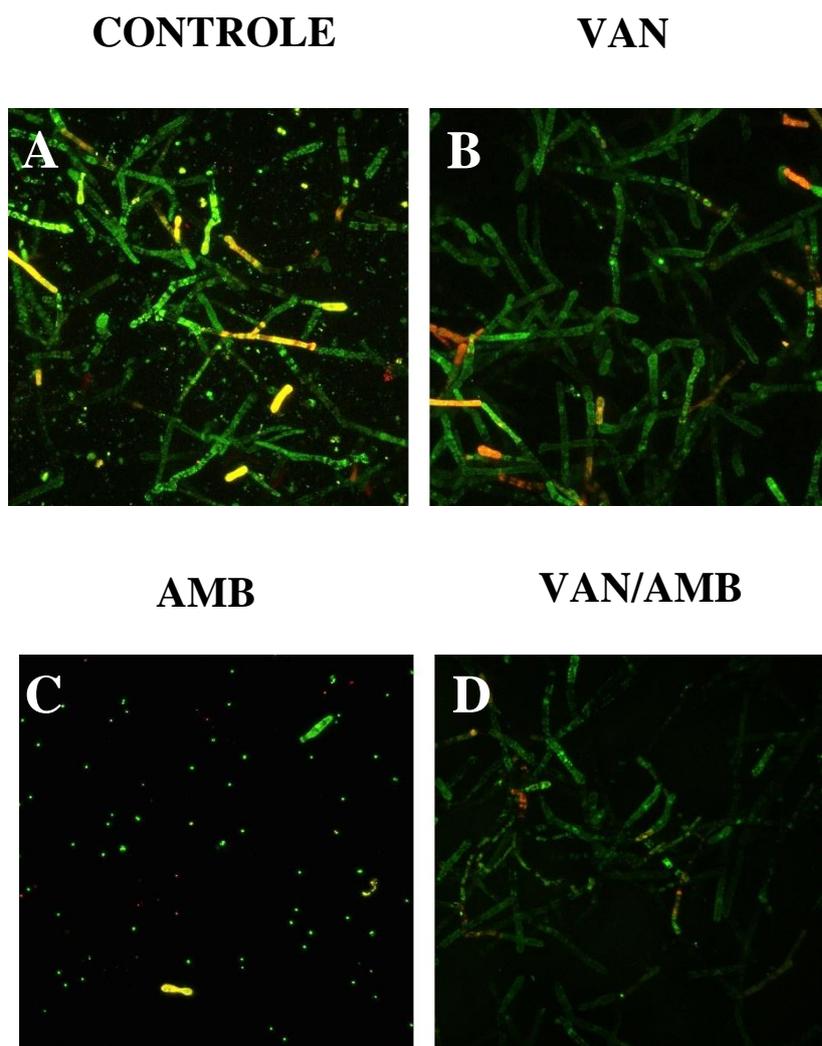


Figura 15. Ação da VAN frente ao biofilme de *T. inkin*. Imagens ilustram biofilme controle maduro cultivado sem VAN (A), biofilme maduro cultivado com VAN (B), biofilme maduro cultivado sem VAN e tratados com 100 μ g/mL de AMB (C), e biofilme maduro cultivado com VAN e tratado com 100 μ g/mL de AMB (D).

7. DISCUSSÃO

A tricosporonose invasiva é uma doença fúngica oportunista emergente que afeta pacientes imunocomprometidos. Estudos anteriores concluíram que o uso terapêutico e / ou profilático de antimicrobianos (antibióticos e antifúngicos) em tais pacientes vulneráveis é considerado um fator de risco inequívoco para muitas infecções fúngicas invasivas (IFIs), incluindo tricosporonose invasiva também (ALMEIDA JÚNIOR; HENNEQUIN, 2016; CHALLAPILLA et al., 2019; GARG et al., 2018; GABRIEL, ACCOCEBERRY, 2011; RUAN, CHIEN, HSUEH, 2009; RASTOGI, NIRWAN, 2007; MARTY, BAROUCH, COAKLEY, 2003; MATSUE et al., 2006; NEGI et al., 2015).

Relatos de casos de tricosporonose invasiva descrevem um cenário clínico dinâmico e complexo no qual pacientes em risco, mesmo aqueles sem neoplasias hematológicas, são expostos a antibióticos para prevenir infecções oportunistas ou para tratar infecções de origem / etiologia desconhecida (GARG et al., 2018; GABRIEL, ACCOCEBERRY, 2011; RUAN, CHIEN, HSUEH, 2009; RASTOGI, NIRWAN, 2007). Embora haja uma grande variação no esquema de antibioticoterapia viável em tais pacientes, a VAN é um dos medicamentos reservados para infecções complicadas graves. De fato, tricosporonose invasiva oportunista tem sido descrita em pacientes suscetíveis após e / ou uso profilático de VAN (MARTY, BAROUCH, COAKLEY, 2003; MATSUE et al., 2006; NEGI et al., 2015).

Já foi comprovado em estudos anteriores com espécies de *Candida*, que os antibióticos podem estar interferindo na proliferação fúngica (SAMONIS et al., 2006a; 2006b; 2013; BEN-AMI et al., 2012; DOLLIVE et al., 2013). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que o VAN no PP estimula o crescimento planctônico e a atividade proteolítica de *Candida* spp. (CORDEIRO et al., 2018). Outras investigações mostraram que os antibióticos β -lactâmicos aumentam a produção de biofilme por *C. albicans*, tornando esta estrutura mais tolerante à caspofungina (CORDEIRO et al., 2019).

Ainda não há estudos sobre os efeitos dos antibióticos sobre o metabolismo e virulência de espécies do *Trichosporon*. Mediante testes preliminares, resolveu-se investigar a ação do glicopeptídeo vancomicina na virulência, nas formas planctônicas e na estrutura dos biofilmes das cepas deste gênero fúngico.

O presente estudo mostrou que a VAN - considerado um antibiótico de último recurso para o tratamento de sepse e infecções graves causadas por bactérias Gram positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina - foi capaz de aumentar o crescimento de *T. inkin* e *T. asahii* tanto no planctônico quanto em forma séssil.

Em forma planctônica, observou-se que a análise pela técnica de redução por XTT, as cepas que foram expostas aos antibióticos na concentração do PP mostram-se mais estimuladas do que a droga em PP/2. Estes dados corroboram com um estudo anterior liderado por nosso grupo (CORDEIRO et al., 2018) onde a vancomicina mostrou significância estatística no crescimento planctônico e no volume celular de *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

Em nossos experimentos *in vitro* os biofilmes de *Trichosporon* spp., mostraram-se estimulados pelo antibiótico em todos os tempos de adição da droga e para as duas espécies testadas, no que diz respeito a sua atividade metabólica e biomassa. Assim como nas análises na forma planctônica, as cepas apresentaram maior estímulo e significância da droga na concentração do seu PP, mesmo que em PP/2 ela ainda produza efeitos estimulatórios. Um estudo realizado por Vogel et al., (2013) mostrou que a rifampicina mostrou-se capaz de aumentar a virulência e a formação de biofilmes de *Candida albicans*, deste modo, observamos que os antibacterianos como estes podem estar interferindo no crescimento de espécies de *Candida* e *Trichosporon*.

Estes resultados sugerem que o biofilme que recebeu a droga, possui uma maior capacidade proliferativa, um metabolismo mais ativo/eficaz e uma biomassa mais robusta. Levando em consideração as afirmações bibliográficas (EVANS et al., 1980; BEN-AMI et al., 2012; SAMONIS et al., 2013; PANDA et al., 2014; LIAO et al., 2015; VISCOLI, 2016) em que o uso de antibióticos está entre os fatores de riscos para proliferação de espécies fúngicas como *Candida* spp., e *Trichosporon* spp., dentro de um organismo vivo com a disbiose do hospedeiro. A utilização desta droga em pacientes com tricosporonose invasiva pode agravar em alto grau o quadro desses pacientes, onde a colonização e o agrupamento em forma de biofilmes deste gênero fúngico iria ter um maior crescimento, robustez e tolerância as drogas antifúngicas de escolha.

Uma das características mais marcantes dos biofilmes microbianos é a formação espontânea de células dormentes (“células persistentes”) dentro da comunidade séssil.

Essas células não convencionais mostram uma tolerância pronunciada aos antimicrobianos - ainda maior do que as células relacionadas ao biofilme (NEGI et al., 2015). As células persistentes podem escapar da resposta imune do hospedeiro; uma vez removido o antimicrobiano, ele pode crescer e repovoar o ambiente, favorecendo a ocorrência de infecções secundárias (JAYARAMAN, 2008). Dentre as espécies de fungos, células persistentes foram descritas inicialmente em biofilmes de *C. albicans*, estando associadas à tolerância antifúngica dessas comunidades sésseis (LA FLEUR, KUMAMOTO, LEWIS, 2006).

Recentemente, foi demonstrado que ambos os biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii* são propensos a formar células persistentes (Cordeiro et al., em andamento), corroborando com os dados de LaFleur, Kumamoto e Lewis (2006) com cepas de *Candida albicans* e Al-Dhaheri e Douglas (2008) com cepas de *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. No presente estudo, foi demonstrado que a VAN aumentou o número de células persistentes dentro dos biofilmes. Concomitantemente, foram realizados ensaios de sensibilidade com essas células que sobreviveram ao tratamento com AMB (células persistentes), posteriormente tratadas com AMB. As células oriundas de biofilmes cultivados com VAN mostraram-se menos responsivas a sensibilidade com AMB, do que os biofilmes controles cultivados sem VAN.

Esses dados sugerem que em biofilmes de *Trichosporon* spp., quando tratados com AMB, são capazes de tolerar o tratamento antifúngico com a permanência de células persistentes no interior do biofilme, principalmente se houver o contato com o antibacteriano vancomicina, como mostrado neste estudo. Assim, estas células podem a qualquer momento reativarem seu metabolismo, formando novamente um novo biofilme. Hipotetiza-se que o uso empírico de VAN pode estimular a produção de subpopulações resistentes a AMB dentro de biofilmes de *Trichosporon* spp., o que poderia trazer um desafio adicional ao tratamento invasivo da tricosporonose em pacientes suscetíveis.

VAN também foi capaz de aumentar a virulência de células de *T. inkin* e *T. asahii*, conforme observado no modelo de infecção experimental *C. elegans*. De fato, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, o potencial desse modelo para a análise da virulência do *Trichosporon*. Foi visto que *T. inkin* e *T. asahii* são capazes de matar o nematóide e, provavelmente, fatores de virulência comumente necessários para infecção em mamíferos - como enzimas líticas, glucuronoxilomanano e melanina (DUARTE-OLIVEIRA et al.,

2017) - são ativados durante a infecção por *C. elegans*. Mais estudos devem ser realizados para entender o efeito de VAN na expressão de genes de virulência em *Trichosporon* spp.

Por fim, a vancomicina foi capaz de alterar a estrutura dos biofilmes de *Trichosporon inkin* e *Trichosporon asahii*, onde em análise por MEV e MCVL os biofilmes expostos ao antibiótico mostraram um aumento na quantidade de células leveduriformes e hifas e após a exposição a AMB observou-se a destruição da maioria destas células, contudo, nota-se que a imagem do biofilme que foi cultivado com o antibiótico e posteriormente tratado com AMB contém uma maior quantidade de leveduras e hifas do que o biofilme que recebeu apenas o tratamento com AMB. Estes dados entram em concordância com os outros ensaios dos estudos, onde as cepas que foram expostas à VAN mostram um maior aumento na quantidade e robustez.

O presente estudo mostrou que o VAN foi capaz de estimular o crescimento de *T. inkin* e *T. asahii*, induzir alterações morfológicas e fisiológicas em seus biofilmes e também aumentar sua virulência em modelo experimental de infecção. Mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao efeito antibacteriano em *Trichosporon* spp. deve ser determinado posteriormente. Os resultados fortalecem a relação entre o uso excessivo de antibióticos e o surgimento de IFIs. Os médicos devem estar cientes do efeito direto de VAN em *Trichosporon* spp. supercrescimento e virulência.

8. CONCLUSÕES

- ✓ Vancomicina foi capaz de estimular o crescimento da atividade metabólica de células planctônicas de *Trichosporon* spp.
- ✓ Vancomicina aumentou a atividade metabólica e biomassa dos biofilmes de *Trichosporon* spp.
- ✓ Vancomicina demonstrou virulência de *Trichosporon* spp pelo modelo experimental utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*.
- ✓ Vancomicina aumentou a quantitativamente a produção de células persistentes.
- ✓ Vancomicina tornou as células persistentes de *Trichosporon* spp. menos responsivas a AMB.
- ✓ Vancomicina foi capaz de alterar a morfologia e ultraestrutura de células sésseis de *Trichosporon* spp.

REFERÊNCIAS

- ALCOCK, J.; MALEY, C. C.; AKTIPIS, C. A. Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms. **Bioessays**, v. 36, n. 10, p. 940-949, 2014.
- AL-DHAHERI, R. S.; DOUGLAS, L. J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1884-1887, 2008.
- ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Infecção invasiva por *Trichosporon*: uma revisão sistemática sobre um patógeno fúngico reemergente. **Fronteiras em microbiologia**, v. 7, p. 1629, 2016.
- ALMEIDA, N. L. M. et al. Equisetum giganteum e Punica granatum associados a adesivo protético: atividade antimicrobiana contra biofilmes de *Candida albicans*. **Archives of Health Investigation**, v. 5, 2017.
- ANAISSE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. Clinical mycology. **Annals of Internal Medicine**, v. 138, n. 9, p. 776, 2003.
- ANDERSON, J. M et al. NOD2 influences trajectories of intestinal microbiota recovery after antibiotic perturbation. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, 2020.
- ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 5, p. 400, 2014.
- ARNON, S.I; LITMANOVITZ, I. Diagnostic tests in neonatal sepsis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 3, p. 223-227, 2008.
- ATEHORTUA, M. V. A. et al. Trichosporonosis en un paciente con leucemia aguda. **Acta Colombiana de Cuidado Intensivo**, v. 17, n. 1, p. 68-75, 2017.
- BARTH JUNIOR, V. C. **Avaliação da formação de células persistentes em *Acinetobacter baumannii***. 2014. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- BAYM, M; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, n. 6268, 2016.
- BEHREND, G. Ueber Trichomycosis nodosa (Juhel-Rénoy): *Piedra* (Osorio). **Berliner Klinische Wochenschrift**, v. 27, p. 464-467, 1890.
- BEN-AMI, R. et al. Antibiotic exposure as a risk factor for fluconazole-resistant *Candida* bloodstream infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2518-2523, 2012.
- BENTUBO, H. D, L; GAMBALE, W; FISCHMAN, O. Caracterização laboratorial e comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, 2013.
- BENTUBO, H. D. L.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNAses by different species of *Trichosporon*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 377-387, 2014.
- BEURMANN, L.; GOUGEROT, H. AND VAUCHER, H. Oidiomyose gommeuse, ulcéreuse, disséminée. Mycose nouvelle, due à un parasite nouveau: l'*Oidiumcutaneum*

- (ancien groupedesBlastomycoses). **Revue de Médecine Interne**, v. 30, p. 937-958, 1940.
- BREGER, J et al. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 2, p. 18, 2007.
- BRILHANTE, R. S. N et al. An al An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans* sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato. **Mycoses**, p. 1-6, 2017.
- BRILHANTE, R. S. N et al. *In vitro* inhibitory effect of statins on planktonic cells and biofilms of the *Sporothrix schenckii* species complex. **Journal of Medical Microbiology**, p. jmm001195, 2020.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12a ed. Rio de Janeiro: AMGH Editora Ltda, 2012. v. 7.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. Antifungals, **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2016.
- CANO-PALLARES, C. et al. Piedra blanca y otras infecciones causadas por *Trichosporon* spp. **Dermatología Revista Mexicana**, v. 60, n. 6, p. 499-507, 2016.
- CARVALHO, M.H.G.F et al. L-dihydroxyphenylalanine induces melanin 74 production by members of the genus *Trichosporon*. **FEMS yeast research**; v.14; n.6; p. 988- 991. 2014.
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.
- CASTANHEIRA, M. et al. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 85, n. 2, p. 200-204, 2016.
- CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (US). **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services, 2013.
- CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the Genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166, p. 121-132, 2008.
- CHALLAPILLA, M. et al. *Trichosporon*–Blood Stream Infection. **Journal of The Association of Physicians of India**, v. 67, p. 19, 2019.
- CHANG, Y et al. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v.8, p. 222-236, 2017.
- CHEVEREAU, G; BOLLENBACH, T. Systematic discovery of drug interaction mechanisms. **Molecular systems biology**, v. 11, n. 4, p. 807, 2015.
- CHO, O.; MATSUKURA, M.; SUGITA, T. Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. **International Journal of Infection Diseases**, v. 38, p. 87- 88, 2015.
- CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006290, 2017.

- CIMOLAI, N. **Laboratory diagnosis of bacterial infections**. CRC Press, 2001.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 219-138, 2014.
- COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, p. 25-30, 2007.
- COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 682-700, 2011.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- CORDEIRO, R. A et al. Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiology**, v. 162, p. 309-317, 2015a.
- CORDEIRO, R. A et al. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v.64, p. 1277-1286, 2015.
- CORDEIRO, R. A et al. β -lactam antibiotics & vancomycin increase the growth & virulence of *Candida* spp. **Future Microbiology**, v. 13, n. 08, p. 869-875, 2018.
- CORDEIRO, R. A. et al. Cefepime and amoxicillin increase metabolism and enhance caspofungin tolerance of *Candida albicans* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- CORDEIRO, R. A. et al. Sodium butyrate inhibits planktonic cells and biofilms of *Trichosporon* spp. **Microbial pathogenesis**, v. 130, p. 219-225, 2019.
- COX, G. M.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon* species. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, 9th ed. London: Arnold Press, p, p. 461-484, 1997.
- DABAS, Y; XESS, I; KALE, P. Molecular and antifungal susceptibility study on trichosporonemia and emergence of *Trichosporon* mycotoxinivorans as a bloodstream pathogen. **Medical Mycology**, v. 55, n. 5, p. 518-527, 2017.
- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.
- DAY, J. N. et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 14, p. 1291-1302, 2013.
- DE HOOG, G. S et al. **Atlas of clinical fungi**. 2th ed., Guanabara, Rio de Janeiro, 2000.
- DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet**, v. 362, n. 9390, p. 1142-1151, 2003.
- DI BONAVENTURA, G et al. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture and antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n.10, p. 3269-3276, 2006.
- DINIZ, L. M; DE SOUZA FILHO, J. B. Estudo de 15 casos de *pedra branca* observados na Grande Vitória (Espírito Santo-Brasil) durante cinco anos. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 1, p. 49-52, 2005.

- DOLLIVE, S. et al. Fungi of the murine gut: episodic variation and proliferation during antibiotic treatment. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71806, 2013.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.
- DUARTE-OLIVEIRA, C. et al. The cell biology of the *Trichosporon*-host interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 118, 2017.
- ENOCH, D. A. et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections. In: **Human Fungal Pathogen Identification**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 17-65.
- ESSER, K.; KURZAI, O. Human Fungal Pathogens. In: **The Mycota**. 2 ed. London: Springer, vol. 12, 2014. 298 p.
- EVANS, Harry L. et al. Systemic mycosis due to *trichosporon cutaneum* a report of two additional cases. **Cancer**, v. 45, n. 2, p. 367-371, 1980.
- FAGUNDES JÚNIOR, A. A. P. et al. Emergência de infecção por *Trichosporon asahii* em pacientes portadores de insuficiência cardíaca em unidade de terapia intensiva cardiológica: relato de caso e revisão da literatura. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2008.
- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.
- FERNANDES, A. Manzani et al. Endocardite Fúngica por *Trichosporon asahii*: Relato de caso e Revisão da Literatura. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p. 87-88, 2018.
- FERREIRA, F. R et al. *Piedra Branca* por *Trichosporon ovoides* no Sudeste do Brasil: Relato e Breve Revisão da Literatura. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 77, n. 2, p. 157-160, 2019.
- FOND, G. et al. The “psychomicrobiotic”: Targeting microbiota in major psychiatric disorders: A systematic review. **Pathologie Biologie**, v. 63, n. 1, p. 35-42, 2015.
- FONSECA, F. L. et al. Structural and functional properties of the *Trichosporon asahii* glucuronoxylomannan. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6-7, p. 496-505, 2009.
- FOSTER, C. E. et al. Trichosporonosis in pediatric patients with a hematologic disorder. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 7, n. 3, p. 199-204, 2018.
- FOSTER, J. A.; NEUFELD, KA. McVey. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. **Trends in neurosciences**, v. 36, n. 5, p. 305-312, 2013.
- FURLANETO-MAIA, L. et al. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2007.
- GABRIEL, F.; NOEL, T.; ACCOCEBERRY, I. Fatal invasive trichosporonosis due to *Trichosporon loubieri* in a patient with T-lymphoblastic lymphoma. **Medical mycology**, v. 49, n. 3, p. 306-310, 2011.
- GALDIERO, E. et al. Eradication of *Candida albicans* persister cell biofilm by the membranotropic peptide gH625. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

- GARG, V. et al. Invasive trichosporonosis treated with voriconazole. **Jaad Case Reports**, n. 4, p.362-364, 2018.
- GILBERT, D. N. et al. **The Sanford guide to antimicrobial therapy**. New York: Antimicrobial Therapy, 2003.
- GIRMENIA, C. et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1818-1828, 2005.
- GROSS, J. W.; KAN, V. L. *Trichosporon asahii* infection in an advanced AIDS patient and literature review. **Aids**, v. 22, n. 6, p. 793-795, 2008.
- GUÉHO, E et al. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 61, p. 289-316, 1992.
- GUÉHO, E et al. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**, v. 37, p. 3-10, 1994.
- GUÉHO, E.; DE HOOG, G.S. AND SMITH, M.T.H. Neotypification of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 61, p. 285-289, 1992.
- GUIDA, F. et al. Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 67, p. 230-245, 2018.
- HICKS, R. W.; HERNANDEZ, J. Perioperative pharmacology: a focus on vancomycin. **AORN journal**, v. 93, n. 5, p. 593-599, 2011.
- HILL, J. A.; COWEN, L. E. Using combination therapy to thwart drug resistance. **Future microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1719-1726, 2015.
- HOY, J. et al. *Iricnosporon beigellii* Infection: A Review. **Reviews of infectious diseases**, v. 8, n. 6, p. 959-967, 1986.
- ICHIKAWA, T et al. Phenotypic switching and β -N-Acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. **Microbiol. Immunol.**, v. 48, n. 4, p. 237-242, 2004.
- ICHIKAWA, T. et al. Structural studies of a cell wall polysaccharide of *Trichosporon asahii* containing antigen II. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 19, p. 5098-5106, 2001.
- INÁCIO, C. P. **Modelo de infecção in vitro da *pedra branca*, análise dos aspectos morfológicos, ultraestruturais e abordagem de identificação polifásica dos agentes etiológicos**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- ISAAC, S. et al. Short-and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 1, p. 128-136, 2016.
- ITURRIETA-GONZÁLEZ, I. A et al. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109553, 2014.
- IZUMI, K.; HISATA, Y.; HAZAMA, S. A rare case of infective endocarditis complicated by *Trichosporon asahii* fungemia treated by surgery. **Annals of thoracic**

and cardiovascular surgery: official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia, v. 15, n. 5, p. 350-353, 2009.

JAYARAMAN, R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. **Journal of biosciences**, v. 33, n. 5, p. 795-805, 2008.

JOHNSON, S et al. Sustained clinical response as an endpoint in treatment trials of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4043-4045, 2012.

JUNG, D. S. et al. Uncommon *Candida* species fungemia among cancer patients, Houston, Texas, USA. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 11, p. 1942, 2015.

KAPLAN, W. et al. *Piedra* in lower animals. A case report of white piedra in a Monkey and a review of the literature. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 134, n. 3, p. 113-117, 1959.

KIM, S.; COVINGTON, A.; PAMER, Eric G. The intestinal microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. **Immunological reviews**, v. 279, n. 1, p. 90-105, 2017.

KING, A. M. et al. Aspergillomarasmine A overcomes metallo- β -lactamase antibiotic resistance. **Nature**, v. 510, n. 7506, p. 503-506, 2014.

KONEMAN E.W et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Medsi. 2001

KRCMERY JR, V. et al. Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. **Supportive Care in Cancer**, v. 7, n. 1, p. 39-43, 1999.

KULLBERG, B. J; ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445-1456, 2015.

KWAN, B. W. et al. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1468-1473, 2013.

LACAZ, C. S. et al. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. **São Paulo: Sarvier**, 1998.

LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, Carol A.; LEWIS, Kim. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3839-3846, 2006.

LAGREE, K.; MITCHELL, A. P. Biofilmes Fúngicos: Inside Out. **Espectro Microbiológico**, v. 5, n. 2 de 2017.

LEAF, H. L.; SIMBERKOFF, M. S. Invasive trichosporonosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 160, n. 2, p. 356-357, 1989.

LEVIN, A. S. S. Guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares. In: **Guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares**. 2007. p. 191-191.

LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. Supplement_1, p. S5-S12, 2006.

- LEWIS, B. B. et al. Loss of microbiota-mediated colonization resistance to *Clostridium difficile* infection with oral vancomycin compared with metronidazole. **The Journal of infectious diseases**, v. 212, n. 10, p. 1656-1665, 2015.
- LEWIS, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. In: **Bacterial biofilms**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 107-131, 2008.
- LIAO, Y et al. Epidemiology and outcome of *Trichosporon* fungemia: A review of 185 reported cases from 1975 to 2014. **Open Forum Infect. Dis.**, v. 2, n. 4, p.141, 2015.
- LIU, Lei et al. Vancomycin exposure caused opportunistic pathogens bloom in intestinal microbiome by simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). **Environmental Pollution**, p. 114399, 2020.
- LIU, X.Z et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, v. 81, p.85–147, 2015.
- LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134-140, 2017.
- LOPES, P. S. G. **Identificação de candidatos vacinais em potencial para *Trichosporon asahii* por vacinologia reversa**. 2018. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2018.
- MADIGAN, M. T et al. **Microbiologia de Brock**. 10a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MAGALHÃES, A. R et al. *Trichosporon* isolation from human ungueal infections: is there a pathogenic role? **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 2, p. 173-179, 2016.
- MAGALHÃES, A. R. **Caracterização Morfológica E Bioquímica de isolados Clínicos de *Trichosporon* spp. no Rio De Janeiro**. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.
- MARAKI, S et al. Effects of doxycycline, metronidazole and their combination on *Candida* species colonization of the human oropharynx, intestinal lumen and vagina. **J. Chemother.**, v. 15, n. 4, p. 369–373, 2003.
- MARINÉ, M et al. On and under the skin: emerging basidiomycetous yeast infections caused by *Trichosporon* species. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004982, 2015a.
- MARINÉ, M et al. The development of animal infection models and antifungal efficacy assays against clinical isolates of *Trichosporon asahii*, *T. asteroides* and *T. inkin*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 476-486, 2015b.
- MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents Chemother.** v. 50, n. 3, p. 1021-1033, 2006.
- MARTY, F. M. et al. Disseminated trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5317, 2003.
- MATSUE, Kosei et al. Breakthrough trichosporonosis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin. **Clinical infectious diseases**, v. 42, n. 6, p. 753-757, 2006.

- MATTEDE, M. G. S et al. Infecções urinárias causadas por *Trichosporon* spp. em pacientes graves internados em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 27, n. 3, p. 247-251, 2015.
- MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 103-124, 2016.
- MERSEGUEL, K. B et al. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 57, p. 1-11, 2015.
- MESSIAS SILVESTRE A.J et al. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a brazilian population. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41, 628-634, 2010.
- MODI, S. R. et al. Antibiotics and the gut microbiota. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 10, p. 4212-4218, 2014.
- MONTOYA, A. M. et al. Cytokines profile in immunocompetent mice during *Trichosporon asahii* infection. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p. 103–109, 2018.
- MORAIS-BRAGA, M.F.B et al. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n.2, p. 302-313, 2017.
- MORI, Y. et al. Marked renal damage in a child with hydronephrosis infected by *Trichosporon asahii*. **Pediatric Nephrology**, v. 20, n. 2, p. 234-236, 2005.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 848 p
- NEGI, V. et al. Disseminated trichosporonosis due to *Trichosporon asahii* in a diabetic patient. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 246, 2015.
- NICHELE, S. M.; ZIMMERMANN, E. S.; BRUCKER, N. Monitoramento terapêutico de voriconazol no manejo de infecções fúngicas invasivas. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 20, n. 2, p. 581-590, 2019.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 9, p. 719-727, 2010.
- PANDA, S et al. Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95476, 2014.
- PAPON, N et al. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm, **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, 2013.
- PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.
- PARAHYM, A. M. R. C. **Infecções fúngicas nosocomiais em unidade de terapia intensiva: ocorrência e controle**. 2016. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- PEETERS, E.; NELIS, H.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**. v. 72, n. 2, p. 157-165, 2008.

- PEREIRA, D. N. et al. Disseminated *Trichosporon* spp infection in preterm newborns: a case report. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85, n. 5, p. 459-461, 2009.
- PEREIRA, T. C. D.; BARROS, R. A. M. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **Facider**, v. 1, n. 1, 2012.
- PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.
- PERUSINHA, C. G; ROSADO, C.; LENCASTRE, A. Novos Avanços no Tratamento da Onicomiose. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 77, n. 3, p. 239-243, 2019.
- PFALLER, M. A. et al. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 1, p. 396-399, 2011.
- PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M. Nosocomial candidiasis: antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. **Medical mycology**, v. 54, n. 1, p. 1-22, 2015.
- PISTORI, R. P. Endocardite fúngica por *trichosporon asahii*: relato de um caso raro em imunocompetentes. **Revista/Suplemento da SOCESP**, v. 29, n. 1, p. 100-103, 2019.
- PONTES, Z. B. V. S. et al. Clinical and mycological study of scalp white piedra in the state of Paraíba, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 747-750, 2002.
- RAMAGE, G et al. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-14, 2012.
- RAMAGE, G. et al. Our current understanding of fungal biofilms. **Critical reviews in microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340-355, 2009.
- RASTOGI, V. L.; NIRWAN, P. S. Invasive trichosporonosis due to *Trichosporon asahii* in a non-immunocompromised host: a rare case report. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 59, 2007.
- RIOS, J. F. S; ROMANELLI, R. M. C. Candidíase invasiva em unidade neonatal. **Journal of Infection Control**, v. 5, n. 1, 2016.
- RIVERA, R; CANGIR, A. *Trichosporon* sepsis and leukemia. **Cancer**, v. 36, n. 3, p. 1106-1110, 1975.
- ROBBINS, N.; WRIGHT, G.D; COWEN, L.E. Antifungal Drugs: The current armamentarium and development of new agents. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.5, p. FUNK 0002-2016, 2016.
- ROSEN, T. et al. Onychomycosis: epidemiology, diagnosis, and treatment in a changing landscape. **Journal of Drugs in Dermatology: JDD**, v. 14, n. 3, p. 223-233, 2015.
- RUAN, SY; CHIEN, JY; HSUEH, Po-Ren. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p. e11-e17, 2009.

- SAMONIS, G et al. Effects of carbapenems and their combination with amikacin on murine gut colonisation by *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 56, n. 2, p. 105–109, 2013.
- SAMONIS, G et al. Effects of vancomycin, teicoplanin, linezolid, quinupristin-dalfopristin, and telithromycin on murine gut colonization by *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 44, n. 2, p. 193-196, 2006a.
- SAMONIS, G et al. Comparative effects of ertapenem, imipenem, and meropenem on the colonization of the gastrointestinal tract of mice by *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 44, p. 233-235, 2006b.
- SANGUINETTI, M. et al. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. Supplement_2, p. ii27-ii37, 2019.
- SANTANA, D. P. et al. Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.
- SCHULFER, A. F. et al. Intergenerational transfer of antibiotic-perturbed microbiota enhances colitis in susceptible mice. **Nature microbiology**, v. 3, n. 2, p. 234-242, 2018.
- SCHWARTZ, R. A. Superficial fungal infections. **The Lancet**, v. 364, n. 9440, p. 1173-1182, 2004.
- SERPA, R. **Biofilmes de *Trichosporon asahii* e *Trichosporon inkin*: aspectos morfofisiológicos, sensibilidade a antifúngicos e inibição mediada por ritonavir**. 2016. 118 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) - Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- SHABAAN, A. E. et al. Role of serum (1, 3)- β -d-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 94, n. 5, p. 559-565, 2018.
- SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.
- SIDRIM, J. J. C et al. β Lactam antibiotics and vancomycin inhibit the growth of planktonic and biofilm *Candida* spp.: An additional benefit of antibiotic-lock therapy? **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 45, n. 4, p. 420–423, 2015.
- SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz dos Autores Contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.
- SILVA, Camila Delfino Ribeiro da; SILVA JÚNIOR, Moacyr. Estratégias para uso adequado de antibioticoterapia em unidade de terapia intensiva. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 448-453, 2015.
- SILVA, R. B. **Candidemia em um hospital público do nordeste do Brasil: características epidemiológicas e fatores de risco em pacientes críticos**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- SILVESTRE JUNIOR, A. M. **Sistemática molecular de *Trichosporon* spp. Baseada em genes ribossomais e sua correlação com fatores de virulência e epidemiologia**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009

- SILVESTRE JUNIOR, A. Me.; MIRANDA, M. A. B. R.; CAMARGO, Z. P. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a Brazilian population. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 628-634, 2010.
- SINGH, S. et al. Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Infections Caused by *Trichosporon* species: An Emerging Non-*Candida* and Non-*Cryptococcus* Yeast Worldwide. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 536, 2019.
- SOMENZI, C. C; RIBEIRO, T. S.; MENEZES, A. Características particulares da micologia clínica e o diagnóstico laboratorial de micoses superficiais. **NewsLab**, v. 77, p. 106-18, 2006.
- SOUSA, J. K. **Efeito estimulatório da Vancomicina, Amoxicilina, Cefepime e Meropenem sobre o crescimento e na atividade Proteolítica de Células Planctônicas e Sésseis de *Trichosporon* spp.** 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- STRYJEWSKI, M. E.; COREY, G. R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. **Clinical infectious diseases**, v. 58, n. suppl_1, p. S10-S19, 2014.
- SUZUKI, K. et al. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. **European journal of haematology**, v. 84, n. 5, p. 441-447, 2010.
- TAMBE, S. A. et al. Two cases of scalp white piedra caused by *Trichosporon ovoides*. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 75, n. 3, p. 293, 2009.
- TAVERNA, C. G et al. Molecular Identification, Genotyping, and Antifungal Susceptibility Testing of Clinically Relevant *Trichosporon* Species from Argentina. **Medical Mycology**, v. 52, n. 4, p. 356–366, 2014.
- TERRA, M. R.; SILVA, R. S. Vancomicina – um antimicrobiano de importância nosocomial. **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research**, Londrina, v. 19, n. 3, p.76-80, 2017.
- UPPULURI, P. et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 3, p. e1000828, 2010.
- VAZQUEZ, J. A. *Trichosporon* Infection. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 1, p. 52-58, 2010.
- VINCENT, B. M et al. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. **PLoS Biol**, v. 11, n. 10, p. e1001692, 2013.
- VISCOLI, C. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 248– 251, 2016.
- VOGEL, M et al. Rifampicin induced virulence determinants increase *Candida albicans* biofilm formation. **F1000 Research**, v. 2, n. 106, 2013.
- WALSH, T. J et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 1, p. 44-66, 2004.
- WANG, H et al. A Comprehensive Evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS MatrixAssisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Yeasts, Part of the National China Hospital Invasive

- Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study, 2012 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n.5, p. 1376–1380, 2016.
- WATSON, K. C. KALLICHURUM, S. cutaneum. **Journal of medical microbiology**, v. 3, n. 1, p. 191-193, 1970.
- WOLF, Dana G. et al. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4420-4425, 2001.
- WOOD, K. B. et al. Uncovering scaling laws to infer multidrug response of resistant microbes and cancer cells. **Cell reports**, v. 6, n. 6, p. 1073-1084, 2014.
- WOOD, T. K. Strategies for combating persister cell and biofilm infections. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1054-1056, 2017.
- WRIGHT, G. D.; WALSH, C. T. D-Alanyl-D-alanine ligases and the molecular mechanism of vancomycin resistance. **Acc. Chem. Res.**, v. 25, n. 10, p. 468–473, 1992.
- XIE, J. L. et al. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**. vol. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.
- YANG, MF; GAO, H.; LI, L.. A fatal case of *Trichosporon asahii* fungemia and pneumonia in a kidney transplant recipient during caspofungin treatment. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 10, p. 759, 2014.
- ZAITS, C.; et. al. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998.
- ZAR, F. A. et al. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 3, p. 302-307, 2007.
- ZHANG, L. et al. Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3659-3666, 2013.
- ZIMBRES, A. C. G. et al. A glucuronoxylomannan-like glycan produced by *Trichosporon mucoides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 121, p. 46-55, 2018.
- ZIMMERMANN, G. R.; LEHAR, J; KEITH, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. **Drug discovery today**, v. 12, n. 1-2, p. 34-42, 2007.