

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

Curso de Biomedicina

Julia Moreira Hoffmann

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Trichosporon* spp., PROVENIENTES DE DIFERENTES  
CENTROS MÉDICOS DO BRASIL E SUAS IMPLICAÇÕES NO  
PROGNÓSTICO DA DOENÇA

São Paulo

2017

Julia Moreira Hoffmann

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Trichosporon spp.*, PROVENIENTES DE DIFERENTES  
CENTROS MÉDICOS DO BRASIL E SUAS IMPLICAÇÕES NO  
PROGNÓSTICO DA DOENÇA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Dyana Alves Henriques, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2017

**Julia Moreira Hoffmann**

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Trichosporon* spp., PROVENIENTES DE DIFERENTES  
CENTROS MÉDICOS DO BRASIL E SUAS IMPLICAÇÕES NO  
PROGNÓSTICO DA DOENÇA**

São Paulo, 30 de outubro de 2017

---

Professora Dra. Dyana Alves Henriques

---

Professora MsC Jeane Bueno Facioli

## **Dedicatória**

Este trabalho é dedicado aos meus pais, que durante tantos anos de suas vidas abdicaram de seus próprios sonhos em prol dos meus.

## Agradecimentos

Ao meu **Pai Celestial** por me guiar neste caminho. Sozinha eu jamais chegaria a lugar algum.

À minha mãe **Dagelene**, por me acompanhar em minhas longas noites de estudo, por todo incentivo, confiança e amor. Sem você eu nada seria!

Ao meu pai **Paulo**, pela confiança que à mim demonstrou durante esta caminhada. Por todo seu sacrifício e amor! Reconheço, e sou eternamente grata por seu esforço em me ver realizada.

Aos meus irmãos **Rebeca e Paulo Henrique**, pela compreensão e paciência que demonstraram em meus momentos de ansiedade e estresse. Desejo busquem conhecimento e que saibam que vocês podem ser tudo o que quiserem ser!

Ao meu tio **Junot Santos** (*in memoriam*) por me ensinar desde a minha infância que o respeito é a mais bela demonstração de amor!

Ao meu amado **Rafael**, pela compreensão, paciência, pelo ombro amigo nos momentos obscuros e por seu infinito amor. Obrigada por escolher dividir seu universo comigo, tem sido uma honra.

Ao **Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo**, a quem tenho enorme respeito e admiração, por abrir as portas de seu laboratório, mostrando a mim um mundo de conhecimentos e possibilidades.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Analy Salles de Azevedo Melo**, por me receber, me ensinar e me orientar neste projeto.

À **MsC Elaine Cristina Francisco**, por seu exemplo de honestidade e compromisso com os resultados. Nunca aprendi tanto como quando compartilhávamos a bancada! Sou muito grata por sua paciência e amor ao me ensinar! À você desejo uma vida de sucessos e sorrisos constantes.

À **MsC Soraia Lopes** e ao **Diego Betto**, que desde o meu primeiro dia no LEMI me instruíram e me presentearam com algo incrível, sua amizade.

À **Carolina Cordeiro**, minha companheira de bancada e, posteriormente, de estágio supervisionado, muito obrigada por me ensinar, da melhor maneira possível, tudo o que sabe! Anseio pelo dia em que me tornarei uma profissional exemplar assim como você! Te tenho como um exemplo!

Aos meus colegas do **LEMI**, por todo apoio na realização deste projeto.

À minha eterna amiga **Érica Possibom**, que esteve ao meu lado em meus piores momentos, e que milhares de vezes esqueceu de suas próprias dores para aliviar as minhas. Minha companheira de faculdade e agora de vida; que você alcance seus objetivos e que seu caminho seja lindo!

Ao **Walter Possibom**, à **Cristina Possibom** e **Ariadne Possibom**, por me receberem de braços abertos e por todo apoio e incentivo que deram a mim e à Érica Possibom.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Dyana Henriques**, por seu amor à docência e por acreditar em seus alunos. Suas aulas tão singulares despertaram em mim uma paixão que tem como resultado este projeto.

Ao **CNPQ** pelo incentivo e custeio da pesquisa realizada.

## Epígrafe

### Eu aprendi

Que a melhor sala de aula do mundo  
Está aos pés de uma pessoa mais velha;

Eu aprendi  
Que ser gentil é mais importante do que estar certo;

Eu aprendi  
Que eu sempre posso fazer uma prece por alguém  
Quando não tenho a força para ajudá-lo de alguma outra forma;

Eu aprendi  
Que não importa quanta seriedade a vida exija de você.  
Cada um de nós precisa de um amigo brincalhão  
Para se divertir junto;

Eu aprendi  
Que algumas vezes tudo o que precisamos  
É de uma mão para segurar  
E um coração para nos entender;

Eu aprendi  
Que dinheiro não compra classe;

Eu aprendi  
Que são os pequenos acontecimentos diários  
Que tornam a vida espetacular;

Eu aprendi  
Que debaixo da "casca grossa"  
Existe uma pessoa que  
Deseja ser apreciada, compreendida e amada;

Eu aprendi  
Que Deus não fez tudo num só dia  
O que me faz pensar que eu possa?

Eu aprendi  
Que quando você planeja se nivelar com alguém,  
Apenas está permitindo que essa pessoa  
Continue a magoar você;

Eu aprendi  
Que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa  
É me cercar de gente mais inteligente do que eu;

Eu aprendi  
Que cada pessoa que a gente conhece  
Deve ser saudada com um sorriso;

Eu aprendi  
Que a vida é dura,  
Mas eu sou mais ainda;

Eu aprendi  
Que quando o ancoradouro se torna amargo  
É porque a felicidade vai aportar em outro lugar;

Eu aprendi  
Que devemos sempre ter palavras doces e gentis  
Pois amanhã talvez tenhamos que engoli-las;

Eu aprendi  
Que um sorriso  
É a maneira mais barata de melhorar sua aparência;

Eu aprendi  
Que não posso escolher como me sinto,  
Mas posso escolher o que fazer a respeito;

Eu aprendi  
Que quanto menos tempo tenho,  
Mais coisas consigo fazer.

Eu aprendi  
Que todos querem viver no topo da montanha,  
Mas toda felicidade e crescimento  
Ocorre quando você está escalando-a;

Ao refletir sobre tudo isso,  
Aprendi que tenho muito a aprender.  
E que se alguém pensa saber tudo,  
É porque não aprendeu como convém saber!

**Trechos do poema "I have learned" de William Shakespeare**

HOFFMANN, Julia Moreira. **AValiação DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS CLíNICOS DE *Trichosporon* spp., PROVENIENTES DE DIFERENTES CENTROS MÉDICOS DO BRASIL E SUAS IMPLICAÇÕES NO PROGNÓSTICO DA DOENÇA.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

Leveduras do gênero *Trichosporon*, consideradas patógenos oportunistas emergentes, estão entre a segunda ou terceira causa de infecções invasivas em ambiente hospitalar, destacando-se pacientes portadores de doenças hematológicas malignas, neutropênicos e em uso de dispositivos médicos invasivos. A identificação de *Trichosporon* spp. por técnicas fenotípicas apresenta acurácia limitada, sendo as ferramentas moleculares as mais indicadas para identificação das espécies deste gênero. Na literatura há poucos trabalhos que estudaram a capacidade de formação de biofilme por isolados patogênicos de *Trichosporon*. **Objetivos:** Avaliar a capacidade de formação de biofilme de isolados de *Trichosporon* sp. obtidos de pacientes com infecções fúngicas invasivas atendidos em diferentes centros médicos brasileiros e relacionar os dados obtidos com o desfecho clínico de cada caso. **Material e métodos:** Foram utilizados 31 isolados de infecções invasivas por *Trichosporon* sp. recebidos ao longo de 18 anos, sendo esses provenientes de amostras de hemoculturas positivas. A identificação das espécies foi realizada por PCR e sequenciamento da região IGS1 do rDNA utilizando os *primers* 26SFe 5SR. A avaliação da formação de biofilme foi realizada pela quantificação da biomassa total por meio da coloração com cristal violeta. **Resultados:** Dos 31 isolados de *Trichosporon* sp. analisados, a espécie *T. asahii* foi a mais frequente (26 isolados) seguida de *T. asteroides* e *T. inkin* (2 isolados cada) e *T. faecale* (1 isolado). Em relação à formação de biofilme avaliada pela coloração com cristal violeta, todos os isolados apresentaram capacidade de adesão, sendo *T. asahii*, *T. inkin* e *T. asteroides* as espécies que apresentaram maior biomassa. Dos 31 isolados estudados apenas 7 foram considerados para correlação entre formação de biofilme e desfecho clínico desfavorável, dos 7 isolados 5 eram altos formadores, 1 era médio formador e 1 era baixo formador de biofilme. **Conclusões:** *T. asahii* foi a espécie mais prevalente nos isolados de hemoculturas analisados. Quanto à produção de biofilme, *T. asahii* e *T. inkin* foram classificados como altos formadores, *T. asteroides* como médio formador e *T. faecale* como baixo formador de biofilme. Dos 7 isolados de *Trichosporon* spp. considerados para análise de correlação entre formação de biofilme e mortalidade dos pacientes, 71,4% possuíam alta capacidade de produção de biofilme e eram da espécie *Trichosporon asahii*.

Palavras-chave: Biofilmes. Prognóstico. *Trichosporon* sp. Tricosporonose.

HOFFMANN, Julia Moreira. **EVALUATION OF BIOFILME FORMATION BY CLINICAL ISOLATES OF *Trichosporon* spp., FROM DIFFERENT MEDICAL CENTERS OF BRAZIL AND IMPLICATIONS IN THE PROGNOSIS OF THE DISEASE.** Completion of Work Course (Bachelor in Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

Yeasts of the genus *Trichosporon*, considered to be emerging opportunistic pathogens, are among the second or third cause of invasive infections in a hospital setting, with hematologic malignancies, neutropenic diseases and invasive medical devices. Identification of *Trichosporon* spp. by phenotypic techniques presents limited accuracy, with molecular tools being the most suitable for identification of species of this genus. In the literature there are few studies that studied the capacity of biofilm formation by pathogenic isolates of *Trichosporon*. **Objectives:** To evaluate the biofilm formation capacity of *Trichosporon* sp. obtained from patients with invasive fungal infections treated at different Brazilian medical centers and to relate the data obtained with the clinical outcome of each case. **Material and methods:** 31 isolates of invasive infections by *Trichosporon* sp. received over 18 years, and these were from samples of positive blood cultures. Identification of the species was performed by PCR and sequencing the IGS1 region of the rDNA using the 26SFe 5SR primers. The evaluation of biofilm formation was performed by quantifying the total biomass by means of staining with violet crystal. **Results:** Of the 31 isolates of *Trichosporon* sp., *T. asahii* was the most frequent (26 isolates) followed by *T. asteroides* and *T. inkin* (2 isolates each) and *T. faecale* (1 isolate). In relation to the biofilm formation evaluated by violet crystal staining, all the isolates presented adhesion capacity, being *T. asahii*, *T. inkin* and *T. asteroides* the species that presented the highest biomass. Of the 31 isolates studied, only 7 were considered for correlation between biofilm formation and unfavorable clinical outcome, of the 7 isolates 5 were high formers, 1 was a medium forming agent and 1 was a low biofilm builder. **Conclusions:** *T. asahii* was the most prevalent species in blood culture isolates analyzed. As for biofilm production, *T. asahii* and *T. inkin* were classified as high formers, *T. asteroides* as forming medium and *T. faecale* as low biofilm builder. Of the 7 isolates of *Trichosporon* spp. considered for correlation analysis between biofilm formation and patient mortality, 71.4% had high biofilm production capacity and were of the *Trichosporon asahii* species.

Keywords: Biofilm. Prognostic. *Trichosporon* sp. Tricosporonosis.

## Lista de figuras

**Figura 1:** Esquema de identificação fenotípica de leveduras.....05

**Figura 2:** Representação das regiões do DNA ribossômico incluindo o alvo da amplificação utilizado para a identificação acurada de *Trichosporon* spp.....14

**Figura 3:** (A) Cultura de *Trichosporon* sp. em SDA evidenciando o aspecto opaco e cerebriforme das colônias. (B) Macromorfologia de isolado de *Trichosporon* evidenciando a coloração branca/ creme característica do gênero. (C) Microscopia de luz onde se observa a presença de artroconídios, estrutura empregada na caracterização de *Trichosporon* sp.....19

**Figura 4:** Quantificação do biofilme por coloração de cristal violeta.....23

## Lista de tabelas e gráficos

**Tabela 1:** Relação de isolados utilizados neste estudo armazenados no Banco de Micro-organismos do Laboratório Especial de Micologia da UNIFESP/EPM.....11

**Tabela 2:** Isolados utilizados neste estudo e suas respectivas identificações obtidas por métodos moleculares.....21

## Lista de abreviaturas e símbolos

%	Porcentagem
BLASTn	Basic local alignment search tool nucleotide
CBS	Centraalbureau voor Schimmelculture
CVC	Cateter Venoso Central
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
EPS	matriz Exopolissacarídica
g	Gramas
IFI	Infecções fúngicas invasivas
IGS	Intergenic Spacer
ITS	Internal Transcriber Spacer
mL	Mililitros
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nano molar
OD	Densidade óptica
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Solução nutritiva para cultivo celular
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
TAE	Tampão Tris-acetato EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
YEPD	Yeast extract peptone dextrose
µL	Microlitros
µmol	Micro mol

# SUMÁRIO

<b>Dedicatória</b> .....	iii
<b>Agradecimentos</b> .....	iv
<b>Epígrafe</b> .....	vi
<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Lista de figuras</b> .....	x
<b>Lista de tabelas e gráficos</b> .....	xi
<b>Lista de abreviaturas e símbolos</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 O gênero <i>Trichosporon</i> .....	1
1.2 Infecções causadas por <i>Trichosporon</i> spp. ....	2
1.2.1 Infecções superficiais .....	3
1.3 Identificação das espécies de <i>Trichosporon</i> sp. ....	5
1.3.1 Identificação fenotípica das espécies de <i>Trichosporon</i> .....	5
1.3.2 Identificação genotípica das espécies de <i>Trichosporon</i> .....	6
1.4 Fatores de virulência observados em espécies de <i>Trichosporon</i> .....	7
1.4.1 Biofilmes: características e importância nas infecções invasivas .....	8
<b>2. OBJETIVO</b> .....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos .....	10
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
3.1 Seleção de isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	11
3.2 Identificação fenotípica dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	12
3.3 Identificação Molecular .....	13
3.3.1 Extração do DNA genômico dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	13

3.3.2	Quantificação do DNA e análise de pureza dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	13
3.3.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	14
3.3.4	Eletroforese em gel de agarose dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. ....	14
3.3.5	Sequenciamento da região IGS1 do rDNA, montagem e edição das sequências dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. ....	15
3.3.6	Análise comparativa entre as sequências consenso estudadas com as depositadas em Bancos genômicos dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. ....	15
3.4	Formação de Biofilme .....	16
3.4.1	Crescimento celular dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. ....	16
3.4.2	Quantificação da concentração celular para a produção do biofilme dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. ....	16
3.4.3	Adesão celular em placas de poliestireno dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	16
3.5	Quantificação do biofilme dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. ....	17
3.6	Relação entre formação de biofilme e a mortalidade dos pacientes.....	17
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
4.1	Identificação fenotípica dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	19
4.2	Identificação molecular .....	19
4.2.1	Extração do DNA e análise de pureza dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. ....	19
4.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e análise da amplificação em gel de Agarose dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	20
4.2.3	Sequenciamento da região IGS1: análise comparativa entre as sequências consenso estudadas com as depositadas em Bancos genômicos .....	20
4.3	Formação de biofilme .....	22

4.3.1 Quantificação da formação de biofilme por coloração de Cristal	
Violeta .....	22
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>43</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O gênero *Trichosporon*

Leveduras do gênero *Trichosporon*, pertencentes ao Filo *Basidiomycota*, Subfilo *Agaricomycotina*, Classe *Tremellomycetes*, Ordem *Tremellales*, Família *Trichosporonaceae*, são amplamente distribuídas na natureza, principalmente em regiões de clima tropical e temperado, sendo encontradas, por exemplo, no solo, água, materiais em decomposição, leite e derivados, regiões hipersalinas e excreta de pombos (COLOMBO *et al.*, 2011). Nos seres humanos *Trichosporon* sp. pode ser constituinte da microbiota da pele, unhas, trato respiratório, digestório e genital, especialmente em mulheres (MARTY *et al.*, 2003). Caracterizadas pela formação de artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas (COX, 1999) as espécies patogênicas do gênero *Trichosporon* são morfologicamente semelhantes, o que as torna facilmente confundíveis (MAGALHÃES *et al.*, 2008; EL-MASHAD *et al.*, 2011).

Quanto a sua macromorfologia, as diferentes espécies de *Trichosporon* apresentam coloração que pode variar de branco a creme/ amarelo acinzentado quando semeadas em Sabouraud dextrose ágar (SDA) e coloração verde-azulada em meio diferencial CHROMagar *Candida*® (Difco), *Trichosporon* spp. são caracterizadas por seu aspecto cerebriforme, opaco e seco com superfície irregular composta por fissuras de diferentes profundidades e direções (COLOMBO *et al.*, 2011).

Até o ano de 2015, *Trichosporon* sp. contava com 51 espécies distintas até que Liu e colaboradores (2015) analisaram a consistência da classe dos Tremelomicetos pela comparação de sequências de 7 genes diferentes. A partir deste trabalho, o gênero foi reclassificado e atualmente, conta com 12 espécies, sendo elas: *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. mucoides*, *T. jirovecii*, *T. dermatis*, *T. pullulans*, *T. loubieri*, *T. domesticum* e *T. montevideense*, as demais deram origem a novos gêneros relacionados.

No entanto, em 2015, Liu *et al.*, realocou espécies previamente atribuídas aos clados Brassicae / Gracile e Porosum do gênero *Trichosporon* para o gênero *Apiotrichum*. A restauração do *Apiotrichum* sp. resultou de uma revisão taxonômica importante da classe *Tremellomycetes* com base em análises filogenéticas de um conjunto de dados de múltiplos genes que incluiu a maioria das leveduras com tremelomicetos.

As leveduras do gênero *Apiotrichum* são distribuídas amplamente em toda a natureza e incluem uma série de espécies associadas ao solo, como *Apiotrichum dulciturum*, *A. laibachii* e *A. loubieri* (SUGITA, 2011). *Apiotrichum domesticum* e *A. montevidense* também são de importância clínica, uma vez que são agentes causadores de pneumonite de hipersensibilidade, uma doença alérgica causada pela inalação repetida de artroconídios, que muitas vezes são encontradas nas casas de pacientes que sofrem desta doença. O gênero atualmente contém 20 espécies (LIU *et al.*, 2015).

O gênero *Cutaneothricosporon* foi proposto por Liu *et al.*, em 2016 para um grupo monofilético que consiste nos clados cutaneum e haglerorum em conjunto com *Trichosporon guehoae*, *Cryptococcus curvatus*, *C. cianovorianos* e *C. daszewskae*.

## 1.2 Infecções causadas por *Trichosporon* spp.

Entre as leveduras, sabe-se que *Candida* spp. são responsáveis por grande número das infecções humanas (PFALLER *et al.*, 2008, CHAGAS-NETO *et al.*, 2009). Entretanto, nos últimos anos, outros gêneros vêm se destacando como patógenos oportunistas emergentes, com grande destaque para *Trichosporon* sp. (COLOMBO *et al.*, 2011, ALMEIDA JR *et al.*, 2017).

*Trichosporon* sp. é agente importante de diversas infecções humanas, promovendo lesões de diferentes níveis de comprometimento, sendo isolados a partir de micoses superficiais, invasivas – localizadas e/ou disseminadas, sendo estas últimas formas de manifestação responsáveis por elevados índices de mortalidade e morbidade (COLOMBO *et al.*, 2011).

### 1.2.1 Infecções superficiais

A partir dos achados de Beigel em 1865, onde foram observados nódulos brancos e irregulares em cabelos de peruca, o gênero *Trichosporon* permaneceu, durante muitos anos, como agente etiológico de diversas micoses superficiais, das quais se destacam lesões de pele e pelo, onicomicoses e otomicoses (GUÉHO *et al.*, 1992; MARTINS *et al.*, 2007; COLOMBO *et al.*, 2011).

*Piedra* branca, principal manifestação clínica superficial, é uma infecção benigna e assintomática, que acomete os pelos da área genital, do couro cabeludo, da barba e do bigode causadas, principalmente por *T. inkin*, em pelos pubianos e *T. ovoides*, em cabelos (RIPPON, 1982; BENSON *et al.*, 1983; KALTER *et al.*, 1986; AVRAM *et al.*, 1987; COLOMBO *et al.*, 2011, VISWANATH *et al.*, 2011; FICHMAN *et al.*, 2014). Macroscopicamente os nódulos de *piedra* branca, compostos por elementos fúngicos, são compactados e podem ser facilmente visualizados no pelo apresentando coloração clara (GUÉHO *et al.*, 1992). Antes destacados como determinantes na prevalência da *piedra* branca, fatores socioeconômicos, higiênicos, gênero e hábitos sexuais, hoje não são mais considerados importantes para alguns autores (THÉRIZOL-FERLY *et al.*, 1994; PONTES *et al.*, 2002; DE ALMEIDA, 2016).

*Piedra* branca é frequentemente observada em elevadas taxas na região norte do Brasil. Os casos de onicomicoses e *tinea pedis* por *Trichosporon* spp. variam de 2,6 a 42,8% (ARCHER-DUBON *et al.*, 2003; MENDEZ-TOVAR *et al.*, 2006; JIMÉNEZ-OLIVEIRA, 2017).

### 1.2.2 Infecções invasivas

O isolamento de *Trichosporon* spp. em infecções sistêmicas tem sido observado com elevada frequência nos últimos anos, fato este que, entre outras causas, justifica-se pelo aumento da população de pacientes

imunocomprometidos (FLEMMING *et al.*, 2002; WALSH *et al.*, 2004; PFALLER E DIEKEMA, 2007; DA SILVA RUIZ, RICHNI, 2016).

O aumento da incidência de doenças degenerativas e malignas em diferentes populações, assim como o maior número de enfermos submetidos a transplantes de órgãos, terapias imunossupressoras, quimioterapia, e antibioticoterapia de amplo espectro, oferece condições para que células fúngicas pertencentes a microbiota alcancem a circulação sanguínea e se tornem capazes de promover infecções invasivas; quadros onde pacientes encontram-se queimados e submetidos a manipulações cirúrgicas também são favoráveis ao desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas (CHAGAS-NETO *et al.*, 2009).

Para as fungemias causadas por *Trichosporon* sp. os aspectos clínicos mais relevantes para o desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas (IFI) são: pacientes onco-hematológicos em uso de dispositivos médicos invasivos (principalmente cateter venoso central), dos quais, em casos de neutropenia persistente, a mortalidade pode ser próxima de 100% (MARTY *et al.*, 2003, COLOMBO *et al.*, 2011, THIEN *et al.*, 2016).

Infecções invasivas por *Trichosporon* spp. são frequentemente associadas ao uso de dispositivos médicos invasivos, onde a doença é frequentemente precedida de colonização do trato respiratório ou gastrointestinal, acometendo, principalmente em pacientes oncológicos, sugerindo que esses dispositivos poderiam atuar como substrato para adesão e possivelmente formação de biofilmes, resultando em menor susceptibilidade a antimicrobianos e à proteção das defesas do hospedeiro (WALSH *et al.*, 2004; ARMITAGE, 2004; CHANDRA; ZHOU; GHANNOUM, 2005).

Apontadas como a segunda ou terceira maior causa de infecções provocadas por leveduras, ficando atrás apenas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, as tricosporonoses apresentam índice de mortalidade alarmantes, chegando a ordem de 80%, mesmo frente a tratamento com antifúngicos (WALSH *et al.*, 2004; BORGES, 2016).

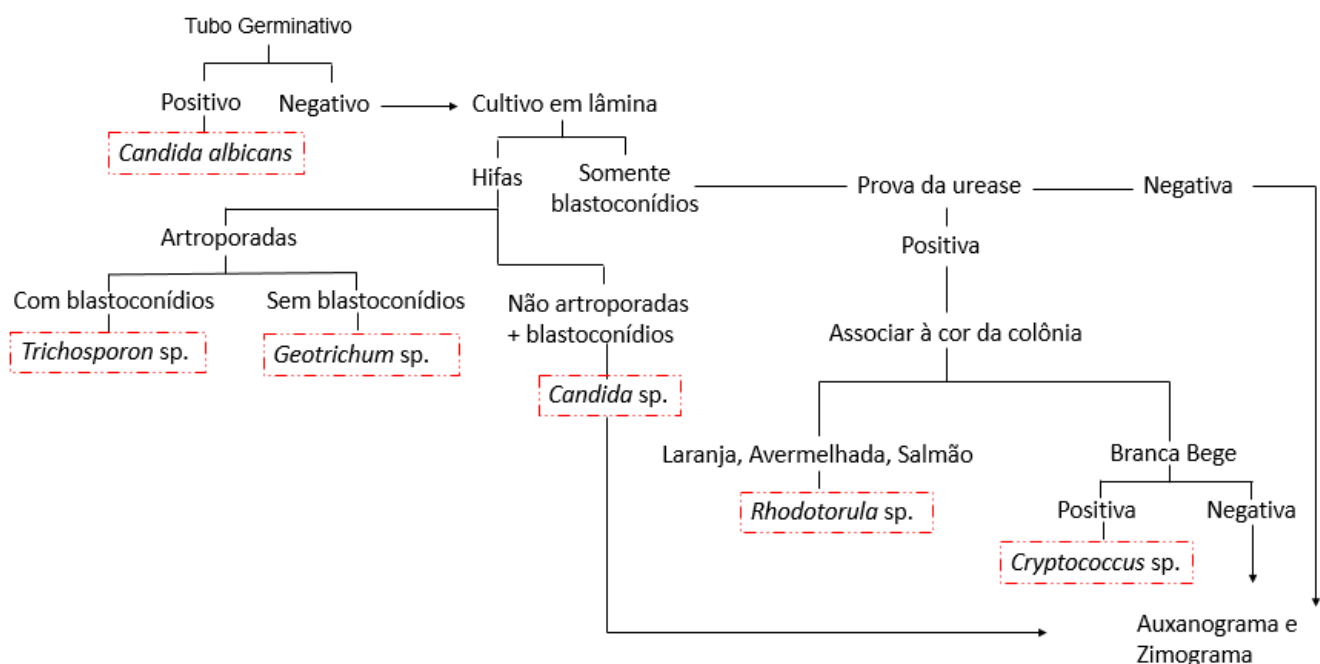
### 1.3 Identificação das espécies de *Trichosporon* sp.

#### 1.3.1 Identificação fenotípica das espécies de *Trichosporon*

Chagas-Neto *et al.*, (2009) enfatizaram as dificuldades a respeito da identificação correta das diferentes espécies e a falta de padronização dos testes de suscetibilidade a antifúngicos, o que tem contribuído para informações limitadas sobre epidemiologia, diagnóstico e principalmente, a terapêutica da tricosporonose.

A identificação fenotípica de isolados de *Trichosporon* baseia-se na avaliação de características fisiológicas, tais como assimilação de diferentes fontes de carboidratos, degradação da ureia e características morfológicas (artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas), assim como ilustrado na figura 1. Entretanto, inúmeros autores relatam a interpretação dos resultados obtidos como subjetiva e variável, demonstrando uma acurácia limitada desses testes (GUEHO *et al.*, 1992; SUGITA *et al.*, 1994, 1995; WALSH *et al.*, 2004, CHAGAS *et al.*, 2008; NASCIMENTO, 2016).

**Figura 1: esquema de identificação fenotípica de leveduras.**



Fonte: (ANVISA, 2014. ADAPTADO).

### 1.3.2 Identificação genotípica das espécies de *Trichosporon*

Mediante a limitada acurácia da caracterização fenotípica e uma vez que nenhum dos testes comerciais disponíveis no mercado contemplam as novas categorias taxonômicas em suas bases de dados, a utilização da biologia molecular é importante ferramenta para a identificação das espécies de *Trichosporon* (AHMAD; AL-MAHMEED; KHAN, 2005; TUDELA *et al.*, 2005; PINCUS; ORENGA; CHALELLIER, 2007).

A técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) e o sequenciamento do DNA tem sido os processos mais promissores empregados na identificação acurada de *Trichosporon spp.*, permitindo a amplificação de regiões conservadas do genoma, como os genes ribossomais (SUGITA *et al.*, 1998). Tais genes possuem regiões extremamente conservadas, alternadas por regiões variáveis, ideais para comparações intraespecíficas e interespecíficas, com a vantagem de se apresentarem em múltiplas cópias no genoma (GUARRO *et al.*, 1999).

O DNA ribossômico codifica as subunidades estruturais dos ribossomos (5S, 18S e 28S), além de compor seus espaçadores, interno (ITS) e intergênico (IGS), que são removidos durante a formação dos ribossomos (GUÉHO *et al.*, 1992; SUGITA *et al.*, 1999).

Pelo sequenciamento e análise de regiões nucleotídicas localizadas no DNA ribossômico, Sugita *et al.*, (1999) concluíram que as espécies de *Trichosporon* de relevância médica poderiam ser identificadas por suas sequências ITS.

Subsequentemente, os mesmos pesquisadores determinaram como melhor potencial discriminativo para espécies filogeneticamente próximas de *Trichosporon* a região IGS1 (*Intergenic Spacer Region*) localizada entre os genes 28S e 5S do DNA ribossômico, uma vez que a região IGS1 variou de 195 a 704 pb. A análise comparativa das sequências nucleotídicas sugere maiores variações na região IGS1 do que na região ITS. Portanto, a utilização do sequenciamento da região IGS1 mostrou-se mais adequada para a

identificação das espécies de *Trichosporon*, e nos dias atuais é considerada a técnica padrão ouro para identificação de espécies (SUGITA *et al.*, 2002; GUO, 2011).

#### 1.4 Fatores de virulência observados em espécies de *Trichosporon*

Hogan e colaboradores (1996) definem fator de virulência, em fungos de importância médica, como qualquer fator que um fungo possua que seja capaz de aumentar sua virulência em um determinado hospedeiro, tais como expressão diferencial de componentes na membrana celular, termotolerância, capacidade de aderência a superfícies abióticas, produção e secreção enzimática, entre outros (HOGAN; LEIN; LEVITZ, 1996).

Responsáveis pela quebra proteica e o rompimento de membranas a atividade enzimática de proteases e fosfolipases, respectivamente, têm sido objeto de diversos estudos. (GHANNOUM, 2000; DAG; CERIKÇIOGLU, 2006; SERPA, 2016).

Capazes de promover dano tecidual e/ou vasodilatação por meio de destruição de proteínas do hospedeiro como o colágeno, elastina, fibrinogênio e imunoglobulinas, as proteinases colaboram para a invasão e disseminação da infecção (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Encarregadas pela hidrólise da ureia à amônia e carbanato, mudando o pH local, as ureases, metaloenzimas que hidrolisam ureia para a produção de amônia e dióxido de carbono, favorecem a sobrevivência da levedura no organismo do hospedeiro. Ureases são fortemente correlacionadas à patogênese em doenças humanas e estão presentes em *Trichosporon* spp. (GHANNOUM, 2000; DAG; CERIKÇIOGLU, 2006).

A habilidade de constituir biofilme tem sido encarada como a principal justificativa frente a infecções crônicas persistentes refratárias a tratamento clínico, isto se dá devido a alta resistência do biofilme a alterações de pH, temperatura e à atividade dos antimicrobianos conferida aos micro-organismos (MAH, 2001; DONLAN, 2002).

#### 1.4.1 Biofilmes: características e importância nas infecções invasivas

Definidos como comunidades celulares sésseis, os biofilmes são caracterizados por células formadoras de comunidades microbianas, aderidas a superfícies bióticas e/ou abióticas. As células se encontram envolvidas por uma complexa matriz extracelular, composta por substâncias polissacarídicas extracelular (EPS), que apresenta grande multifuncionalidade química e espacial, onde, além de preservar a viabilidade celular, a matriz está diretamente envolvida com as características mais importantes dos biofilmes: a resistência à resposta imune do hospedeiro e aos antimicrobianos (KUHN, CHANDRA, GHANNOUM, 2002).

Considerados cruciais no desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas, os biofilmes atuam como nicho de diversos agentes patogênicos. Modificações na expressão de diversos genes relacionados ao metabolismo celular, crescimento e transcrição gênica observadas em micro-organismos associados a biofilmes contribuem para uma acelerada divisão celular quando comparada a micro-organismos na forma planctônica (DONLAN; COSTERTON, 2002; COSTERTON; WILSON, 2003; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; KIEDROWSKI; HORSWILL, 2011).

Devido à patogênese da tricosporonose sistêmica estar intimamente relacionada à presença de dispositivos médicos invasivos, sobretudo cateteres venosos centrais, a capacidade de formação de biofilme nestes dispositivos é um importante fator de virulência que contribui para o estabelecimento do processo infeccioso. Dag e Cerikçioğlu (2006) mostraram que isolados de *Trichosporon* apresentam alta hidrofobicidade celular, uma característica fortemente associada à adesão celular e conseqüentemente à formação de biofilmes. Di Bonaventura *et al.*, (2006) descreveram a habilidade de *T. asahii* aderir e formar biofilmes em superfícies de poliestireno, determinando a presença de biofilmes como fator decisivo na persistência da infecção. Uma vez que o biofilme esteja constituído, células fúngicas podem invadir tecidos em contato com o dispositivo, ou ainda, ser liberadas na corrente sanguínea (KUHN, CHANDRA, GHANNOUM, 2002; SUN *et al.*, 2012; ANITHA *et al.*, 2015; LIAO *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2016).

Iturrieta-Gonzalez *et al.*, (2014) observou em seus experimentos que o gênero *Trichosporon* apresenta alta produção de biofilme com valores de quantificação semelhantes ou superiores aos descritos para *Candida* sp. Além disso parece que *Trichosporon* spp. demonstra produção de biofilme superior a outros basidiomicetos, como *Rhodotorula* spp. e *Cryptococcus* spp.

Ainda há poucos trabalhos na literatura que estudam este importante fator de virulência em espécies do gênero *Trichosporon* e, até o presente momento, é desconhecida sua correlação com taxa de mortalidade dos pacientes acometidos por infecções invasivas por este agente.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de formação de biofilme de espécies patogênicas do gênero *Trichosporon* isolados de pacientes com infecções fúngicas invasivas (IFI).

### 2.2 Objetivos específicos

1. Identificar isolados que apresentam alta capacidade de formação de biofilme.
2. Comparar a capacidade de formação de biofilme de cepas patogênicas de *Trichosporon* sp. provenientes de infecções invasivas com o desfecho clínico dos pacientes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção dos isolados de *Trichosporon* spp.

Para a execução deste estudo foram utilizados 31 isolados obtidos de hemoculturas positivas coletadas de sangue periférico e de cateter venoso central, colhidos em diferentes centros médicos do Brasil (tabela 1), armazenados em temperatura igual a -80°C no Banco de Micro-organismos do Laboratório Especial de Micologia da UNIFESP/EPM.

**Tabela 1: relação de isolados utilizados neste estudo armazenados no Banco de Micro-organismos do Laboratório Especial de Micologia da UNIFESP/LEMI.**

N° LEMI	Sítio de coleta	ID Fenotípica	Origem
1373/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSP
1374/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSP
9206	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSP
9766	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSP
2514	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSP
9379	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSP
9209	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSP
9345	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSP
985/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSP
1375/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	USP
1376/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	USP
1378/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	USP
1379/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	USP
1377/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	USP
1381/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	USP
1382/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	USP
1380/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	USP
8169 A	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	GRAACC
9504	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSPE
9291	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	HSPE

N° LEMI	Sítio de coleta	ID Fenotípica	Origem
8334	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	UFMT
7912	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	UFMT
9189 A	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	Hosp. Câncer Barretos
9468	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	Hospital Municipal do Guarujá
924/17	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	Hosp. Clínicas Porto Alegre
925/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	Hosp. Clínicas Porto Alegre
926/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	Hosp. Clínicas Porto Alegre
927/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	Hosp. Clínicas Porto Alegre
928/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	Hosp. Clínicas Porto Alegre
931/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	Hosp. Clínicas Porto Alegre
9876	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	Hosp. Dante Pazzanese

Legenda: HSP – Hospital São Paulo; USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP; GRAAC - Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer; UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso; HSPE – Hospital do Servidor Público Municipal.

Para a formação do banco de micro-organismos, coletas foram realizadas após consentimento dos respectivos responsáveis. Todos os procedimentos de coleta em humanos atenderam às normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Paulista de Medicina/ UNIFESP.

### 3.2 Identificação fenotípica dos isolados de *Trichosporon* spp.

A identificação fenotípica dos isolados foi realizada de acordo com os métodos convencionais, contemplando as análises da macro e micromorfologia (KURTZMAN; FELL, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000, LACAZ *et al.*, 2002).

Os isolados foram semeados em SDA suplementado com Cloranfenicol (0,05 mg/mL), (ANEXO 2B), e incubados a 37°C por 48 horas (KURTZMAN; FELL, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000).

Com o intuito de garantir a pureza dos isolados, semeaduras por esgotamento foram feitas em ágar cromogênico CHROMagar *Candida*® (ANEXO 2C), desta forma características macroscópicas tais como a coloração

evidenciada pelas colônias presentes foram observadas após 24 e 48 horas de incubação a 37°C.

### 3.3 Identificação Molecular

#### 3.3.1 Extração do DNA genômico dos isolados de *Trichosporon* spp.

A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada seguindo as instruções do fabricante de PREPMan *Reagent Kit* (Applied Biosystem – EUA). Uma colônia pura e isolada de cada isolado foi semeada em YEPD e incubada *overnight* à 37°C sob agitação (180 rpm) para o crescimento fúngico. Uma alíquota de 100µL foi retirada e centrifugada a 16.000 x g por 3 minutos, seguidas de duas lavagens com água Mili-Q ultrapura (Milipore Corporation – Brasil) e novas centrifugações. Subsequentemente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspensas em 100µL de PREPMan submetido a aquecimento na temperatura de 100°C por 10 minutos, e novamente centrifugado para o recolhimento do sobrenadante contendo o material genético, concluindo assim a extração do DNA.

#### 3.3.2 Quantificação do DNA e análise de pureza dos isolados de *Trichosporon* spp.

A partir da extração genômica a quantificação do material genético foi realizada utilizando 2µL do DNA pelo Nanovue Plus (GE), em comprimento de onda equivalente a 260nm. A mensuração de inibidores de PCR, como proteínas e sal, foram considerados em absorvâncias 280nm e 230nm, respectivamente. A razão entre as leituras  $DO_{260}/DO_{280}$  foi empregada na avaliação da pureza do DNA extraído em relação a proteínas presentes no sobrenadante. Subsequente a quantificação, a concentração do DNA foi ajustada para 40ng/µL para ser utilizado na técnica de PCR.

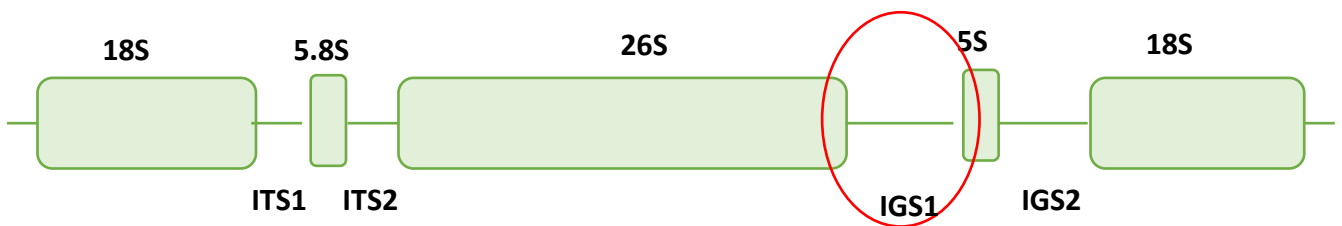
### 3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos isolados de *Trichosporon* spp.

A PCR foi realizada para a amplificação da região IGS1 do rDNA (DNA ribossomal) (Figura 2).

Para a reação foram utilizados 2µL dos *primers* *Foward* 26SF (5' – ATC CTT TGC AGA CGA CTT GA – 3') e *Reverse* 5SR (5' AGC TTG ACT TCG CAG ATC GG – 3') em concentrações de 10 pmol/µL, 2µL do DNA diluído na concentração ideal, 6,5µL de água Mili-Q estéril e 12,5µL de PCR Master Mix (Promega – EUA) que forneceu todos os componentes para que a reação ocorresse corretamente (50 unidades/mL de Taq polimerase, 3mM de cloreto de magnésio, 400 µM de deoxinucleotídeos dATP, dGTP, dCTP e dTTP).

A ciclagem utilizada no termociclador Veriti, 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) foi: denaturação inicial – 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de denaturação – 94°C por 1 minuto, hibridização – 56°C por 1 minuto, extensão – 72°C por 2 minutos e extensão final – 72°C por 10 minutos.

**Figura 2: Representação das regiões do DNA ribossômico incluindo o alvo da amplificação utilizado para a identificação acurada de *Trichosporon* spp.**



Fonte: (COLOMBO *et al.*, 2011. ADAPTADO)

### 3.3.4 Eletroforese em gel de agarose dos isolados de *Trichosporon* spp.

A eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (Ultra Pure Agarose – Invitrogen – EUA) foi realizada com marcadores de peso molecular de 100pb (DNA Ladder - Invitrogen – EUA) utilizando o tampão de corrida TAE 1X [Tris

– acetato – EDTA (*Ethilenediamine tetraacetic acid*) ] (ANEXO 2D). A corrida foi realizada a 90V durante 10 minutos, após este período a voltagem foi modificada para 70V, permanecendo nestas condições por 30 minutos. A observação dos amplicons foi feita com o emprego do corante de gel SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA) e da amostra Orange G EZ Vision Three (Amresco).

### 3.3.5 Sequenciamento da região IGS1 do rDNA, montagem e edição das sequências dos isolados de *Trichosporon* spp.

O DNA amplificado foi sequenciado pelo método de terminação da cadeia por dideoxynucleotídeos (SANGER *et al.*, 1992). Os resultados foram gerados no formato de cromatogramas para a leitura das sequências nucleotídicas.

A obtenção da sequência consenso (*contig*) realizou-se com auxílio dos softwares Blast View e Sequencher 4.1.4 (Gene Codes).

### 3.3.6 Análise comparativa entre as sequências consenso estudadas com as depositadas em bancos genômicos dos isolados de *Trichosporon* spp.

As sequências geradas foram comparadas com sequências depositadas no banco genômico NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para a identificação da espécie estudada. Para isso, foi utilizada a ferramenta BLASTn (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*). As amostras foram comparadas utilizando como critério de qualidade na identificação a identidade e cobertura  $\geq 98\%$  e e-value  $< 10^{-5}$ .

### 3.4 Formação de Biofilme

#### 3.4.1 Crescimento celular dos isolados de *Trichosporon* spp.

A formação do biofilme foi realizada segundo protocolo adaptado por Iturrieta-Gonzales *et al.*, (2015)

Uma colônia de levedura foi inoculada em 3mL de RPMI 1640 (pH 7,0) (Applied Biosystems – EUA) e incubada “*overnight*” a 37°C sob agitação de 180 rpm e aeração. A seguir, transferimos volumes de 2mL da cultura para tubo Eppendorf e centrifugamos o conteúdo a 10.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi aspirado e as células precipitadas lavadas duas vezes com 2mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) estéril, sendo centrifugadas a cada lavagem nas condições descritas. Ao final das lavagens as células foram suspensas em volume igual a 2mL de RPMI 1640 (pH 7,0).

#### 3.4.2 Quantificação da concentração celular para a produção do biofilme dos isolados de *Trichosporon* spp.

As células em suspensão foram quantificadas em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (Amersham Biosciences) no comprimento de onda de 530nm. Com os valores conhecidos, diluições com PBS estéril foram realizadas para que a concentração celular final fosse ajustada em 0,4 OD's, equivalente a  $10^7$  células/mL.

#### 3.4.3 Adesão celular em placas de poliestireno dos isolados de *Trichosporon* spp.

Os inóculos foram adicionados em placas de cultura de poliestireno com fundo chato de 96 poços (TPP), sendo que em cada poço foram adicionados 100µL da suspensão celular, destes foram mantidos como poços controle a primeira e a última coluna da placa nos quais adicionamos somente RPMI 1640

(pH 7,0), a placa foi incubada a 37°C, 70 rpm durante 90 minutos. Os poços foram então lavados duas vezes com 150µL de PBS, a fim de retirar células não aderidas, e 150µL de RPMI 1640 (pH 7,0) frescos foram adicionados. As placas foram incubadas na temperatura e rotação descritas por 48 horas, e o meio de cultura trocado a cada 24 horas.

### 3.5 Quantificação do biofilme dos isolados de *Trichosporon* spp.

Após o período total de formação do biofilme maduro, equivalente a 48 horas de incubação a 37°C e 70 rpm, foi realizada a quantificação da biomassa total.

Após este período as placas foram submetidas a duas lavagens de todos os poços com 200µL de PBS para a retirada de células não formadoras de biofilme (planctônicas).

Para o ensaio com o corante cristal violeta, após o procedimento de secagem da placa por 45 minutos em temperatura ambiente, 110µL da solução corante (0,4%) foram adicionados em cada poço, inclusive nos controles, mantidas e incubadas por 45 minutos. Subsequentemente, os poços foram lavados com 200µL de água estéril de 3 a 5 vezes ou até que o líquido se apresentasse límpido. A descoloração foi realizada com o uso de etanol 95% (ANEXO 2E) por 45 minutos em temperatura ambiente. Finalizado o tempo, foram transferidos 100µL da solução descorada para nova placa (ANEXO 1) e a leitura de absorbância por intermédio de leitor de microplacas Microplate Reader Model 680 (BIO-RAD) foi realizada no comprimento de onda de 570nm.

### 3.6 Relação entre formação de biofilme e a mortalidade dos pacientes

Para esta relação foi considerado, após a positividade de sua hemocultura para *Trichosporon* sp. o desfecho clínico/ morte do paciente infectado com avaliação final até 30 dias pós infecção e em uso de antifúngico

e a correlação com a correspondente capacidade formação de biofilme de seu isolado.

O acesso a estas informações foi realizado por meio da plataforma *online* de sistemas de registros REDCap (*Research Electronic Data Capture*) da Faculdade de Medicina da USP, onde constam os dados clínicos dos isolados pertencentes a Rede *Trichosporon* Brasil com coordenação nacional do Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo.

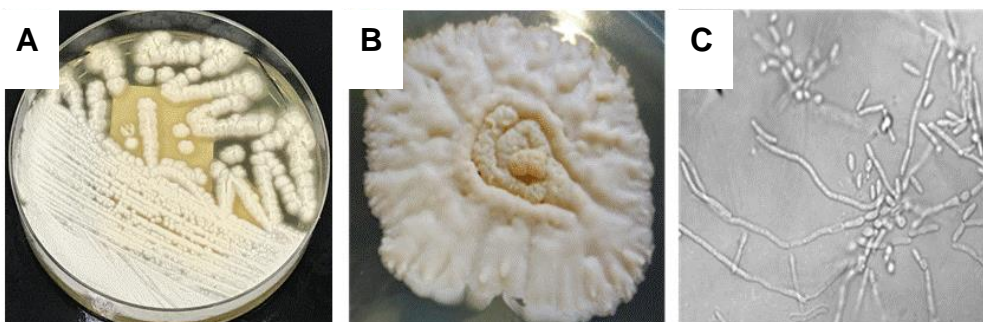
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificação fenotípica dos isolados de *Trichosporon* spp.

Todos os isolados de *Trichosporon* sp. evidenciaram coloração branca/creme quando semeados em *Sabouraud dextrose ágar*, apresentando aspecto cerebriforme, opaco e seco com superfície irregular composta por fissuras de diferentes profundidades e direções após 48 horas de incubação a 37°C.

Em culturas no CHROMagar Candida® (Difco) a coloração observada foi verde-azulada, correspondente ao esperado para o gênero.

**Figura 3: (A) Cultura de *Trichosporon* sp. em SDA evidenciando o aspecto opaco e cerebriforme das colônias. (B) Macromorfologia de isolado de *Trichosporon* evidenciando a coloração branca/creme característica do gênero. (C) Microscopia de luz onde se observa a presença de artroconídios, estrutura empregada na caracterização de *Trichosporon* sp.**



FONTE: (FRANCISCO, 2012)

### 4.2 Identificação molecular

#### 4.2.1 Extração do DNA e análise de pureza dos isolados de *Trichosporon* spp.

A identificação genotípica dos isolados de *Trichosporon* sp. iniciou-se apenas após análise de pureza dos isolados a partir de cultura em meio cromogênico.

O processo de extração de DNA com aplicação do KIT PREPMan foi efetuado com sucesso. A partir deste procedimento obtivemos amostras de alta qualidade, com grau de pureza dentro do previsto (de 1,8 a 2,0 para a relação D260nm/ D280nm).

#### 4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e análise da amplificação em gel de agarose dos isolados de *Trichosporon* spp.

Todos os isolados de *Trichosporon* sp. tiveram seus genes alvos amplificados mediante PCR da região IGS1 do rDNA com os *primers* 26SF e 5SR. A análise dos fragmentos em eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% apresentou um padrão com bandas únicas, não evidenciando contaminações no procedimento realizado.

#### 4.2.3 Sequenciamento da região IGS1: análise comparativa entre as sequências consenso estudadas com as depositadas em bancos genômicos

A comparação das sequências consenso obtidas por sequenciamento com aquelas depositadas no banco genômico do NCBI promoveram a identificação de todos os isolados estudados com grande acurácia, sendo encontrados valores de identidade e cobertura de 100% e e-value de  $<10^{-5}$ .

Na tabela 2 estão apresentadas as espécies encontradas nos 31 isolados testados. *Trichosporon asahii* foi a espécie mais encontrada (26 isolados), seguidos por *Trichosporon asteroides* (02 isolados), *Trichosporon inkin* (02 isolados) e *Trichosporon faecale* (01 isolado).

**Tabela 2: Isolados utilizados neste estudo e suas respectivas identificações obtidas por métodos moleculares.**

<b>N° LEMI</b>	<b>Sítio de coleta</b>	<b>ID Fenotípica</b>	<b>ID Molecular</b>	<b>Origem</b>
1373/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	HSP
1374/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	HSP
985/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. inkin</i>	HSP
9206	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	HSP
9766	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asteroides</i>	HSP
9345	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	HSP
9379	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. faecale</i>	HSP
9209	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	HSP
2514	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	HSP
1375/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	USP
1376/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	USP
1377/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	USP
1378/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	USP
1379/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	USP
1381/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	USP
1382/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	USP
1380/2017	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	USP
8169 A	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asteroides</i>	GRAACC
9504	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	HSPE
9291	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	HSPE
8334	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	UFMT
7912	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	UFMT
9876	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. inkin</i>	Hosp. Dante Pazzanese
9189 A	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	Hosp. Câncer Barretos
924/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	Hosp. Clínicas Porto Alegre
9468	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	Hosp. Municipal de Guarujá
925/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	Hosp. Clínicas Porto Alegre
926/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	Hosp. Clínicas Porto Alegre
927/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	Hosp. Clínicas Porto Alegre
928/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	Hosp. Clínicas Porto Alegre
931/2016	Hemocultura	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. asahii</i>	Hosp. Clínicas Porto Alegre

Legenda: HSP – Hospital São Paulo; USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP; GRAAC - Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer; UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso; HSPE - Hospital do Servidor Público Estadual.

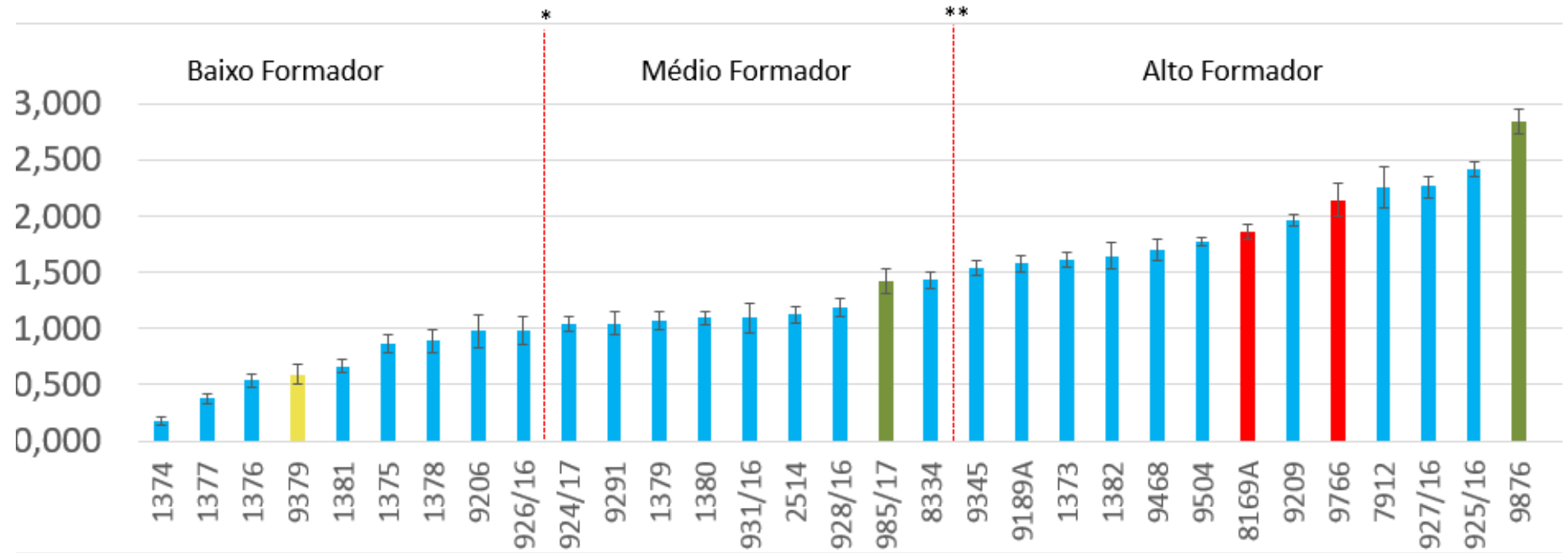
### 4.3 Formação de biofilme

Trinta e uma amostras foram submetidas a formação de biofilme por crescimento em placas de poliestireno de fundo chato. Todas as cepas mostraram reprodutibilidade de ensaio nas três réplicas do protocolo adotado.

#### 4.3.1 Quantificação da formação de biofilme por coloração com Cristal Violeta

Os valores de absorbância obtidos na quantificação por cristal violeta variaram de 0,2 a 2,7 (figura 4). Os isolados foram classificados em baixos, médios e altos formadores de biofilme por intermédio da divisão por *tercis*. *T. asahii* (baixo, médio e alto formador devido a variações intraespecíficas já descritas anteriormente para a espécie) representado pela cor azul, *T. asteroides* (alto formador) representado pela cor vermelha, *T. inkin* (médio e alto formador) pela cor verde e *T. faecale* (baixo formador) pela cor amarela.

Figura 4: Quantificação do biofilme por coloração de cristal violeta.



\*Absorbância  $\leq$  1,000; \*\* absorbância  $\geq$  1,500

■ *T. asahii* ■ *T. faecale* ■ *T. asteroides* ■ *T. inkin*

#### 4.4 Relação entre formação de biofilme e mortalidade dos pacientes

Até o presente momento, dos trinta e um isolados estudados neste trabalho tínhamos os dados referente ao desfecho clínico desfavorável dos pacientes em até 30 dias pós-tratamento instituído, de apenas 7 destes, sendo: 1 baixo formador (9206), 1 médio formador (985/16), e 5 altos formadores de biofilme (927/16, 9345, 1373, 8169A, 7912).

Desta forma, dos isolados considerados nesta análise 71,4% possuíam alta capacidade de formação de biofilme e eram da espécie *T. asahii*.

## 5. DISCUSSÃO

Frequentemente isoladas a partir de amostras de solo, regiões hipersalinas, excretas de pombos, leite e derivados, materiais em decomposição *etc*, as espécies de *Trichosporon* apresentam distribuição mundial. Integrantes da microbiota humana, *Trichosporon* spp. são correntemente encontrado no TGI (trato gastrointestinal), trato respiratório, pele, unhas e região genital (COLOMBO *et al.*, 2011).

Descrito inicialmente em 1865 por Beigel, *Trichosporon* spp. eram associadas apenas a infecções superficiais, como *Piedra* branca, infecção superficial caracterizada pela presença de nódulos moles de coloração clara em pelos. Contudo, nas últimas décadas, *Trichosporon* sp. tem sido descrito como agente causador de endocardites, lesões pulmonares e infecções disseminadas (CHAUMENTIN, *et al.*, 1996).

Em estudo multicêntrico abrangendo 22 isolados de pacientes não portadores de doenças malignas, mas em uso de dispositivos médicos CHAGAS-NETO *et al.*, (2008) evidenciou a virulência do gênero *Trichosporon*.

A reversão do quadro infeccioso e posterior melhora do paciente parece estar associada com a restauração do número de neutrófilos, tendo em vista que neutropenia persistente é resultante em mortalidade aumentada mesmo mediante a terapia antifúngica instituída (HOY, *et al.*, 1986, ALMEIDA JR, *et al.*, 2017).

Dificuldades de identificação e caracterização de *Trichosporon* spp. antes do advento da biologia molecular resultou na grande escassez de informações epidemiológicas relacionadas ao gênero. A identificação fenotípica do gênero e espécies de *Trichosporon* engloba características micromorfológicas e o perfil bioquímico, sendo amplamente utilizados em laboratórios de rotina diagnóstica (AHMAD; AL-MAHMEED; KHAN, 2005; TUDELA *et al.*, 2005; PINCUS; ORENGA; CHALELLIER, 2007; SUGITA *et al.*, 1998).

A observação microscópica de *Trichosporon* sp., evidenciando a presença de artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas bem como a hidrólise de ureia, são resultados determinantes do gênero *Trichosporon*, e definem as etapas seguintes a serem adotadas para identificação das espécies (SUGITA *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2005; CHAGAS-NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008; SILVESTRE JUNIOR, 2009; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011).

Em cultura em ágar Sabourad dextrose, todos os nossos isolados apresentaram coloração e características condizentes com a descrição do gênero, variando do branco ao bege e de aspecto seco e cerebriforme (GUEHO, *et al.*, 1994; DE HOOG, *et al.*, 2000). Já a macromorfologia observada no meio cromogênico CHROMagar *Candida*® (Difco) nos auxiliou para a verificação da pureza das culturas e também na identificação colorimétrica sugestiva ao gênero *Trichosporon*, devendo esta ser azul-esverdeada. Entretanto, há de se considerar que nem todos os isolados apresentaram coloração compatível ao *screening* do gênero, onde, em alguns casos, foi observada coloração rosa. Esta variabilidade foi encontrada principalmente em espécies menos frequentes, como *T. dermatis*, sendo reportada também por outros pesquisadores (GIUSIANO, *et al.*, 2004).

A problemática envolvendo a identificação de *Trichosporon* spp. por meios fenotípicos compromete o regime terapêutico e conseqüentemente o prognóstico, uma vez que limitações dos métodos fenotípicos para a caracterização de espécies de *Trichosporon* são relatadas por diversos autores por apresentarem resultados subjetivos e variáveis (SUGITA, *et al.*, 1998; TUDELA, *et al.*, 2005; COLOMBO; PADOVAN; CHAVES, 2011; DUARTE-OLIVEIRA, 2017).

Um estudo envolvendo três diferentes laboratórios de referência em diagnóstico micológico, com o objetivo de se determinar as características fisiológicas e bioquímicas de seis isolados de *Trichosporon* spp. de importância clínica, apresentou discrepâncias significativas em seus resultados (CHAGAS-NETO, CHAVES E COLOMBO, 2008). Por este motivo, as características fenotípicas observadas nos meios de cultura anteriormente descritos nos

guiaram apenas quanto a confirmação do gênero estudado, ficando a caracterização final das espécies a cargo de ferramentas moleculares.

Desde 1998, a PCR e sequenciamento do rDNA tem sido descritos como métodos rápidos e seguros para identificação de *Trichosporon* spp. (SUGITA, *et al.*, 1998). O rDNA possui vários alvos de amplificação para a identificação acurada das espécies, como as regiões ITS, IGS e a região D1/D2 do gene ribossomal 28S. Para a correta identificação das espécies de *Trichosporon* a região IGS1 apresenta maior variabilidade do que as sequências compreendidas nas regiões ITS1 e ITS2 (SUGITA, *et al.*, 1999).

Em relação ao sequenciamento de nossos isolados clínicos, observamos que a região IGS1 mostrou-se adequada para a identificação acurada das espécies de *Trichosporon* inclusive para aquelas com proximidade filogenética que poderiam ser facilmente confundidas se outro alvo genético fosse utilizado.

Todos os isolados clínicos estudados neste trabalho foram corretamente identificados em nível de espécie, com identidade e cobertura de 100% com as sequências depositadas no GenBank. A correta identificação das cepas referência empregadas como controle de qualidade nesta etapa do estudo confirmaram a sensibilidade e especificidade do método. Apesar de não existir consenso entre os valores à serem adotados nesta comparação a fim de garantir a acurácia deste processo, usualmente são considerados valores acima de 95% e fatores como a qualidade, a variedade e a disponibilidade de sequências disponíveis para determinadas espécies, principalmente aquelas consideradas espécies crípticas, podem impactar nesta porcentagem. (PFALLER, *et al.*, 2012).

Quanto ao fator de virulência estudado neste trabalho, a presença de células aderidas a uma superfície e envoltas por uma matriz extracelular caracteriza a estrutura de um biofilme. A habilidade de formar biofilmes é fundamental na relação parasito-hospedeiro e no desenvolvimento de processos infecciosos, tendo em vista que as células associadas a biofilmes apresentam características fenotípicas distintas, como o aumento da produção de enzimas proteolíticas (DOUGLAS, 2002; KUMAMOTO, 2002; DI BONAVENTURA *et al.*, 2006; GOKCE *et al.*, 2007; HASAN *et al.*, 2009).

A menor susceptibilidade aos antimicrobianos é uma característica evidente em biofilmes fúngicos. Células nessas condições toleram concentrações até 1000 vezes maiores de antifúngicos que células planctônicas (BAILIE e DOUGLAS, 2000; MURKHERJEE e CHANDRA, 2004; DIBONAVENTURA *et al.*, 2006, SUN *et al.*, 2012; RAMAGE *et al.*, 2012 ITURRIETA-GONZALEZ *et al.*, 2014; LIAO *et al.*, 2014). A interação de células planctônicas a determinados substratos é pré-requisito para a adesão celular, que precede a formação de biofilmes microbianos (BLANKENSHIP e MITCHELL, 2006).

Limitações na perfusão de substâncias encontradas nos estudos com biofilmes são frequentemente apontados como possível causa de menor susceptibilidade aos antimicrobianos. O transporte de solutos em culturas de células plânctônicas é mais rápido quando comparado com transporte em agregados microbianos, criando assim condições favoráveis para o crescimento e maturação de estruturas fúngicas (MAH; O'TOLLE, 2001). Células sésseis possuem genes codificadores de bomba de efluxo regulados positivamente, o que resulta em maior expressão de bombas de efluxo reduzindo a susceptibilidade destas células aos antifúngicos (BARBOSA, 2015).

González (2014) estudou a formação de biofilmes de diversas espécies de *Trichosporon* sugerindo um modelo reprodutível e comparativo ao ensaio, fundamentando-se nos protocolos existentes e estabelecidos para as espécies do gênero *Candida*, evidenciando variabilidade intraespecífica quanto à capacidade de adesão para isolados de *Trichosporon* spp. Os resultados integram o maior estudo até então desbravando caminhos para trabalhos posteriores.

Sendo um dos primeiros estudos avaliando a capacidade de adesão e formação de biofilmes de espécies distintas de *Trichosporon*, analisou essas características utilizando protocolo cuidadosamente desenhado. A importância da avaliação quanto à capacidade de adesão em biomaterial representativo na prática médica justifica o uso de poliestireno (Iturrieta-González; 2014)

Para a quantificação do biofilme, utilizamos a coloração por cristal violeta que cora as células vivas e mortas, permitindo assim a quantificação da massa total envolvida (JIN *et al.*, 2003; MELO; COLOMBO; ARTHINGTON-SKAGGS, 2007; TAFF; NETT; ANDES., 2012).

Em nossos resultados, observamos que a quantificação por coloração com cristal violeta permitiu quantificação da adesão celular em todas as amostras. Isolados de *T. asahii* e *T. faecale* apresentaram valores de absorvância similares. Assim como isolados de *T. asteroides* e *T. inkin* também similares, mas com valores mais elevados em relação às demais cepas.

A capacidade de adesão e formação de biofilme dentro das diferentes espécies quantificadas por cristal violeta, revelaram adesão maior de células de *T. asteroides* e *T. asahii*, seguida por *T. inkin* e finalmente por *T. faecale*.

É difícil a comparação de nossos resultados com trabalhos da literatura sobre o tema, uma vez que poucos são os relatos de estudos da formação de biofilmes. Dag *et al.*, (2006) relatam a produção de *slime*, Di Boaventura *et al.*, (2006) não utilizaram quantificação por coloração de cristal violeta e o estudo Gonzáles (2012) não abordou todas as espécies por nós estudadas.

Estudos sobre a estruturas dos biofilmes nas espécies de *Trichosporon* devem ser realizados para maior entendimento das circunstâncias envolvidas em seu desenvolvimento e manutenção, como, por exemplo, a indução gênica e mecanismos de regulação e sinalização tipo *Quorum sensing*, que ajudarão a compreender os mecanismos envolvidos e direcionar ao combate mais eficaz do biofilme na prática clínica (XAVIER, 2003).

Quanto à correlação entre a capacidade de formação de biofilme e o desfecho clínico do paciente infectado com avaliação final até 30 dias pós infecção e em uso de antifúngico, o desfecho clínico desfavorável foi encontrado em todas as categorias de formação, entretanto, a maior parte dos pacientes em óbito foram infectados por cepas caracterizadas como altas formadoras de biofilme.

Dos 31 isolados de *Trichosporon* spp. estudados apenas 7 tinham dados clínicos completos e acessíveis, por este motivo, é difícil qualquer inferência

quanto à correlação estatística entre morte do paciente e formação de biofilme dos isolados.

Os resultados obtidos neste trabalho justificam a necessidade da realização de demais estudos para melhor consolidação da relação entre capacidade de formação de biofilme, diversidade genotípica e desfecho clínico.

## 6. CONCLUSÕES

1. *Trichosporon asahii* foi a espécie mais prevalente entre os isolados de hemoculturas analisados.

2. Quanto à produção de biofilme, isolados de *T. asahii* e *T. asteroides* foram classificados como altos formadores. Isolados de *T. inkin* foram classificados como médios e altos formadores enquanto *T. faecale* foi classificado como baixo formador de biofilme.

3. Dos 7 isolados de *Trichosporon* spp. considerados para a análise entre formação de biofilme e mortalidade dos pacientes, 71,4% possuíam alta capacidade de adesão e eram da espécie *T. asahii*.

4. Estudos futuros, compreendendo maior quantidade de dados clínicos disponíveis, serão necessários para a melhor elucidação entre capacidade de formação de biofilme de *Trichosporon* spp. e desfecho clínico desfavorável de pacientes em quadros de tricosporonose invasiva.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, Suhail; AL-MAHMEED, Manal; KHAN, Zia U. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. **Journal of medical microbiology**, v. 54, n. 7, p. 639-646, 2005.

ALMEIDA, A.A.; CRISPIM, B.A.; GRISOLIA, A.B.; SVIDZINSKI, T.I.E.; ORTOLANI, L.G.; DE OLIVEIRA, K.M.P. Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 62-66, 2016.

ALMEIDA JR, João Nobrega de *et al.*, Emergence of *Trichosporon mycotoxinivorans* (*Apiotrichum mycotoxinivorans*) invasive infections in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 10, p. 719-722, 2017.

ANITHA, S.; PREMAMALINI, T.; JYOTI, K. A. Virulence factors among *Trichosporon* species from clinical isolates in a tertiary care centre **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 4, n. 8, p. 493-501, 2015.

ANVISA. Detecção e identificação de fungos de importância médica. **Agência nacional de segurança sanitária**, v. 1, n. 1, p. 1-50, 2014.

ARCHER-DUBON, C *et al.*, Superficial Mycotic infections of the foot in a Native pediatric population: A pathogenic role of *Trichosporon cutaneum*. **Pediatric Dermatology**, Mexico, v.20, n.4, p. 299-302, 2003.

ARMITAGE, GC. Basic features of biofilms. Why are they difficult therapeutic targets. **Annals of the Royal Australasian College of Dental Surgeons**, California, v. 17, p. 30-34, 2004.

AVRAM, A. *et al.*, Étude clinique et mycologique concernant 11 cas de trichosporie noueuse (piedra blanche) génito-pubienne. In: **Annales de Dermatologie et de Venereologie**. Masson, 1987. p. 819-827.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, n. 3, p. 397-403, 2000.;

BARBOSA, Áurea Priscila Campos. **Biofilmes e resistência antibiótica nas infecções do trato respiratório superior**. 2015. Tese de Doutorado.

BENSON, Paul M.; LAPINS, Nikolajs A.; ODOM, Richard B. White piedra. **Archives of dermatology**, v. 119, n. 7, p. 602-604, 1983.

BLANKENSHIP, Jill R.; MITCHELL, Aaron P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588-594, 2006.

BORGES, Rafael Maggi Justo. **Características clínicas e microbiológicas de infecções causadas por fungos filamentosos em hospital terciário de porto alegre-rs**. 2016.

CARPENTIER, Brigitte; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CASADEVALL, A; PERFECT, JR. *Cryptococcus neoformans*. **American Society for Microbiology**, Washington, p. 541, 1998.

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

CHANDRA, J; ZHOU, G; GHANNOUM, F. Fungal biofilms and antimycotics. **Current Drugs Targets**, Cleveland, v.6, n.8, p. 887-794, Dez 2005.

COLOMBO, Arnaldo L.; PADOVAN, Ana Carolina B.; CHAVES, Guilherme M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 682-700, 2011.

COSTERTON, J. William *et al.*, Microbial biofilms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

COX, G. M.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon* species. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections-medical mycology, 9th ed. **Oxford University Press**, New York, NY, p. 461-484, 1998.

DA SILVA RUIZ, Luciana; RICHNI, Virgínia Bodelão. Importância dos fungos no ambiente hospitalar, 2016.

DI BONAVENTURA, G.; POMPILIO, A.; PICCIANI, C.; IEZZI, M.; D'ANTONIO, D.; PICCOLOMINI, R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture and antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 10, p. 3269-3276, 2006.

DE ALMEIDA, Adriana Araújo et al. Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 48, n. 1, p. 62-66, 2016.

DE HOOG, Gerrit S. *et al.*, **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2000.

DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, p. 139-143, 2002.

DUARTE-OLIVEIRA, Cláudio *et al.*, The Cell Biology of the *Trichosporon*-Host Interaction. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, 2017.

EL-MASHAD, Noha; MAHMOUD, Mohamed Taha; ALLAH EL-SHEWEHY, Heba. *Trichosporon* identification methods for isolates obtained from different

clinical specimens. African **Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 9, p. 1097-1101, 2011.

FISCHMAN, Olga *et al.*, *Trichosporon inkin*: an uncommon agent of scalp white piedra. Report of four cases in brazilian children. **Mycopathologia**, v. 178, n. 1-2, p. 85-89, 2014.

FLEMING, Rhonda V.; WALSH, Thomas J.; ANAISSIE, Elias J. Emerging and less common fungal pathogens. **Infectious disease clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 915-933, 2002.

FRANCISCO, Elaine., Cristina. **Avaliação dos métodos de identificação e estudo da formação de biofilme pelo patógeno emergente *Trichosporon spp.*** Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2012.

GHANNOUM, MA. Potential role of fosfolipases in virulence and fungal patogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, Cleveland, v.13, n.2, p. 122-143, Jan 2000.

GIUSIANO, GE *et al.*, Yeasts species distribution in neonatal intensive care units in northeast Argentina. **Mycoses**, Argentina, v. 47, n. 7, p. 300-303, Ago 2004.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathol.** v.164, p. 265–269, 2007.

GUARRO, Josep; GENÉ, Josepa; STCHIGEL, Alberto M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUEHO, E.; DE HOOG, G. S.; SMITH, M. Th. Neotypification of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 61, n. 4, p. 285-288, 1992.

GUO, Li-Na *et al.*, Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3805-3811, 2011.

HASAN, F.; XESS, I.; WANG, X.; JAIN, N.; FRIES, B.C. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microb. Infec.** v. 11, n. 8, p. 753-761, 2009.

HOGAN, Laura H.; KLEIN, Bruce S.; LEVITZ, Stuart M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 4, p. 469-488, 1996.

ITURRIETA-GONZÁLEZ, Isabel Antonieta *et al.*, Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109553, 2014.

JIMÉNEZ-OLVERA, Héctor Daniel *et al.* Tinea pedis y otras infecciones podales: datos clínicos y microbiológicos en 140 casos. **Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica**, v. 15, n. 3, p. 156-161, 2017.

KALTER, Debra Chester *et al.*, Genital white piedra: epidemiology, microbiology, and therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 14, n. 6, p. 982-993, 1986.

KIEDROWSKI, Megan R. *et al.*, Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e26714, 2011.

KUHN, D. M. *et al.*, Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 878-888, 2002.

KUMAMOTO, C.A. *Candida* biofilms. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 5, p. 608–611, 2002.

LACAZ, C. da S. *et al.*, **Tratado de micologia médica**. 2002.

LIAO, Y.; HARTMANN, T.; ZHENG, T.; YANG, R.Y.; AO, J.H.; WANG, W.L. Breakthrough *Trichosporonosis* in patients receiving echinocandins: case report and literature review. **Chin. Med. J.**, v. 125, n. 14, p. 2632-2635, 2012.

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

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

MAGALHÃES, Alba Regina *et al.*, Morphological and biochemical characterization of the aetiological agents of white piedra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 786-790, 2008.

MAH, Thien-Fah C.; O'TOOLE, George A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MARTIN, Ronny *et al.*, Functional analysis of *Candida albicans* genes whose *Saccharomyces cerevisiae* homologues are involved in endocytosis. **Yeast**, v. 24, n. 6, p. 511-522, 2007.

MARTY, Francisco M. *et al.*, Disseminated *Trichosporonosis* caused by *Trichosporon loubieri*. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5317, 2003.

MENDEZ-TOVAR, LJ *et al.*, Micosis observadas em cinco comunidades mexicanas com alto grado de marginación. **Gaceta Médica de Mexico**, México, v. 142, n.5, p. 381-386, Set 2006.

MURKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resist. Updat.** v.7, p. 301–309. 2004.

NASCIMENTO, Lucas Jardim do. Estratégias de identificação integrada de fungos mediante métodos microbiológicos e não-microbiológicos. 2016.

O'TOOLE, George A.; KOLTER, Roberto. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent

signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, Michael A. *et al.*, Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101510, 2014.

PINCUS, DH; ORENGA, S; CHALELLIER, S. Yeast identification – past, presente and future methods. **Medical Mycology**, Missouri, v. 45, n. 2, p. 97-121, Mar 2007.

PONTES, ZBVS *et al.*, Clinical and Mycological study of Scalp White piedra in the state of Paraíba, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Paraíba, v. 97, n. 5, p. 747-750, Jul 2002.

RAMAGE, G., RAJENDRAN, R., SHERRY, L., WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Inter. J. Microbiol.**, v. 2012, 2012.

RIPPON, John Willard *et al.*, **Medical mycology**; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Eastbourne, UK; WB Saunders Company, 1982.

SERPA, Rosana. **Biofilmes de *Trichosporon asahii* e *Trichosporon inkin*: aspectos morfofisiológicos, sensibilidade a antifúngicos e inibição mediada por ritonavir**. 2016. Tese de Doutorado.

SUGITA, Takashi *et al.*, Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1985-1993, 1999.

SUGITA, Takashi *et al.*, Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1826-1830, 2002.

SUGITA, Takashi; NISHIKAWA, Akemi; SHINODA, Takako. Identification of *Trichosporon asahii* by PCR based on sequences of the internal transcribed spacer regions. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2742-2744, 1998.

SUGITA, Takashi; NISHIKAWA, AKEMI; SHINODA, TAKAKO. Reclassification of *Trichosporon cutaneum* by DNA relatedness by the spectrophotometric method and the chemiluminometric method. The **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 397-408, 1994.

SUGITA, Takashi (2011). *Trichosporon* Behrend (1890). In: The yeasts: a taxonomic study (Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, eds). **Elsevier**, Amsterdam: 2015–2061.

SUN, W.; SU, J.; XU, S.; YAN, D. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence

factors and antifungal susceptibility testing. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, n. 12, p. 1750-1757, 2012.

THÉRIZOL-FERLY, M *et al.*, White piedra and *Trichosporon* species in equatorial Africa. I. History and clinical aspects: na analysis of 499 superficial inguinal specimens. **Mycoses**, França, v.37, n.7, p.249-253, Ago 1994.

THIEN, S. Y. *et al.*, Recurrent *Trichosporonosis* with central nervous system involvement in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, v. 18, n. 5, p. 768-772, 2016.

TUDELA, JL *et al.*, Susceptibility patterns and Molecular identification of *Trichosporon* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Espanha, v. 49, p. 4026-4034, Out 2005.

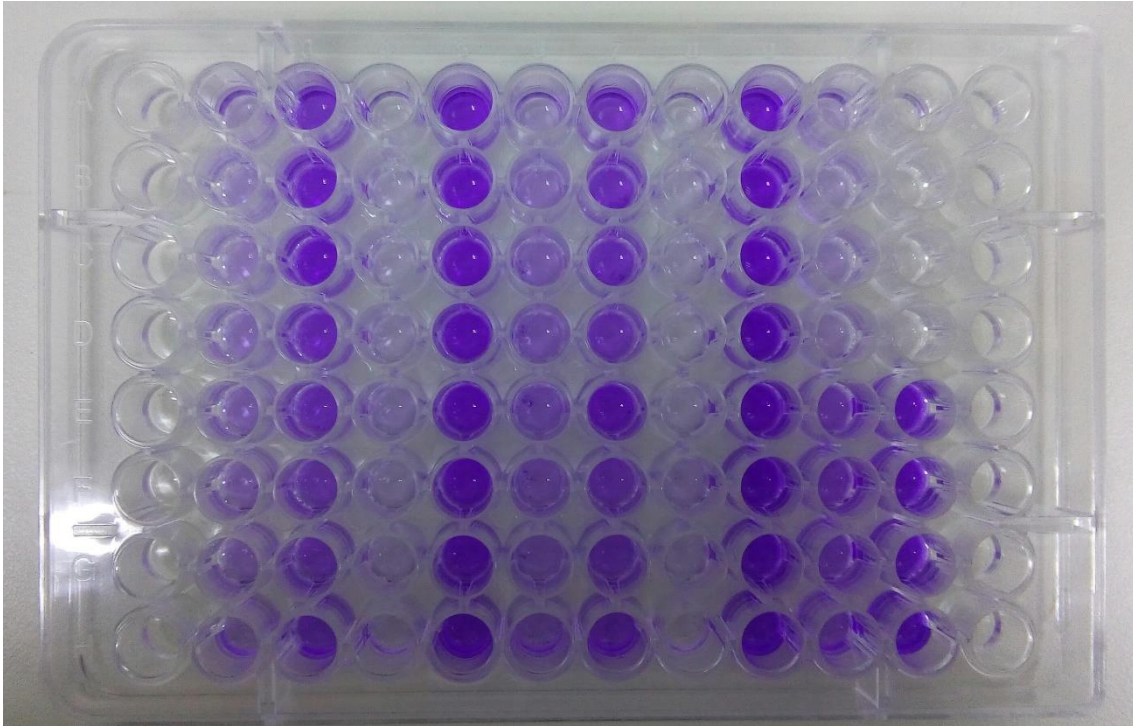
VISWANATH, Vishalakshi *et al.*, White piedra of scalp hair by *Trichosporon* inkin. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 77, n. 5, p. 591, 2011.

WALSH, T. J. *et al.*, Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. s1, p. 48-66, 2004.

YANG, S.; LIAO, Y.; CONG, L.; LU, X.; YANG, R. *In vitro* interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157047, 2016.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Coloração por Cristal Violeta



### ANEXO 2 – Meios de Cultura e Soluções

#### A. Glicerol 80%

- Glicerina 80mL
- Água destilada 20mL

Homogeneizar os componentes, autoclavar por 15 minutos a 121°C e acondicionar em refrigerador até o uso.

#### B. Sabouraud Dextrose Agar

##### - Composição Frasco

Digestão enzimática de caseína	5g
Digestão enzimática de tecido animal	5g
Dextrose	40g

Ágar

15g

Suspender 65g do meio em 1000ml de água, autoclavar 121°C por 15 minutos e acondicionar em refrigerador até o uso.

### **C. CHROMagar Candida®**

- CHROMagar Candida® desidratado 47,7g
- Água destilada 1.000mL

Dissolver o CHROMagar Candida® em água destilada previamente esterilizada, aquecendo em microondas, sem deixar ferver, até completa dissolução. Distribuir em placas de Petri 60 x 15 mm e acondicionar em refrigerador até o uso.

### **D. TAE (50x)**

- Tris base 242 g
- Ácido acético glacial 57,1mL
- EDTA 0,5 M, pH 8,0 100mL
- Água destilada completar até 1.000mL

Dissolver o Tris base em um pouco de água destilada sob agitação, adicionar o EDTA 0,5 M, pH 8,0 e logo o Ácido acético glacial. Completar com água até um volume final de 1 litro.

### **E. Etanol 95%**

- Etanol absoluto 95mL
- Água destilada estéril 5mL

Homogeneizar os componentes e acondicionar em refrigerador até o uso.