



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

LEVEDUROSES SISTÊMICAS: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL COM
ÊNFASE NO CONTROLE DE BIOFILMES

FRANZ DE ASSIS GRACIANO DOS SANTOS

RECIFE
FEVEREIRO/2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**LEVEDUROSES SISTÊMICAS: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL COM
ÊNFASE NO CONTROLE DE BIOFILMES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos do Departamento de Micologia
do Centro de Biociências da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração Micologia Médica

Nome: Franz de Assis G. dos Santos

Orientadora Dr^a Rejane Pereira Neves

Coorientador Dr. Reginaldo Gonçalves de
Lima-Neto

RECIFE

FEVEREIRO/2021

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Santos, Franz de Assis Graciano dos
Leveduras sistêmicas: diagnóstico laboratorial com ênfase no controle de biofilmes
/ Franz de Assis Graciano dos Santos – 2020.

89 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves
Coorientador: Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Leveduras 2. Infecção hospitalar 3. Virulência (microbiologia) I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Lima-Neto, Reginaldo Gonçalves de (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-196

**LEVEDUROSES SISTÊMICAS: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL COM
ÊNFASE NO CONTROLE DE BIOFILMES**

FRANZ DE ASSIS GRACIANO DOS SANTOS

Data da defesa: 23/04/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr^a Rejane Pereira Neves

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Maria Daniela Silva Buonafina Paz

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Michele Maria Godoy

Hospital das Clínicas da UFPE - HC-UFPE

Dr^a Oliane Maria Correia de Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

MEMBROS SUPLENTE

Dr. Luiz Nascimento de Araújo Neto

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Melyna Chaves Leite de Andrade

Universidade Federal de Pernambuco

**Tudo na vida é como termina
que se conta.**

Pr. Márcio Valadão

**O fim de uma coisa vale mais do
que o seu começo.**

Eclesiastes 7:8

Dedico este trabalho a minha família em especial aos meus pais Francisco de Assis e Maria José Assis e as famílias enlutadas das mais de 345.000 vítimas da SARS-CoV-2 no Brasil.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida, sabedoria, amor e por permitir mais essa conquista na minha carreira profissional e, sobretudo, humana.

À Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de crescer profissionalmente através da minha formação, apoio e participação em pesquisas. Ao Centro de Tecnologia e Estratégia do Nordeste (CETENE) e aos Laboratórios de Micologia Médica Sylvio Campos e Imunodiagnóstico pela infraestrutura disponibilizada para realização dos experimentos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa fomentada.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Maria José, pelo amor, carinho, paciência e compreensão diante de tantas horas de ausência, e por simplesmente estarem ao meu lado nas escolhas mais importantes da minha vida. Aos meus irmãos, Franklin e Filêmon, pela amizade e incentivo nesta caminhada.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves, pela acolhida, paciência e confiança em meu trabalho. Agradeço pela amizade e carinho demonstrados, pelos ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidos.

À professora Oliane Magalhães por todo conhecimento transmitido, amizade e acolhimento. Aos professores Danielle Macêdo, Reginaldo Gonçalves e Armando Marsden por sempre estarem dispostos a ajudar e pelos ensinamentos que foram valiosos para meu crescimento científico e intelectual.

A todos os profissionais da UTI Adulto do Hospital das Clínicas da UFPE, sobretudo a Dr^a Michele Godoy pelo respeito a esta pesquisa, acolhimento e aprendizagem. E também, aos colaboradores da UTI Geral e Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Getúlio Vargas, em especial a Dr^a Amália Amorim, obrigado pelo carinho e cuidados dispensados.

Aos bons e verdadeiros amigos que fiz nesta jornada, vocês são a família que escolhi, muito obrigado por tudo, vocês foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa, sou grato por vocês serem mais que amigos, os levarei comigo para sempre.

Aos membros da banca examinadora, pelas considerações mencionadas para melhoria significativa deste trabalho.

Aos pacientes, discentes e funcionários que gentilmente aceitaram colaborar com esta pesquisa, viabilizando, assim, a sua realização.

RESUMO GERAL

A internação de pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de infecções relacionadas à assistência à saúde, sobretudo as de etiologia fúngica. A suscetibilidade a essa infecção pode aumentar em condições como neutropenia, lesão da mucosa, transplante de células-tronco hematopoiéticas ou de tecidos sólidos, terapia imunossupressora, uso de antimicrobianos de amplo espectro, tempo de internação prolongada e uso de cateter venoso central. Além disso, a variação na virulência das espécies de leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* pode influenciar no desenvolvimento e na gravidade dessas infecções. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de virulência de leveduras clínicas, quanto à formação e tratamento de biofilmes. Foram obtidos 87 isolados clínicos pertencentes a 73 pacientes de ambos os sexos com idade variando de 18 a 88 anos, os quais foram caracterizados por meio cromogênio, automação (VITEK2) e por técnica de espectrometria de massa, além da avaliação do perfil de susceptibilidade antifúngica, produção e tratamento de biofilme. Foram identificadas como: *Candida tropicalis* (24/87), *C. albicans* (23/87), *C. parapsilosis* (18/87), *C. glabrata* (13/87), *Cryptococcus neoformans* (4), *Kodamaea ohmeri* (02/87), *C. metapsilosis* (1/87), *C. haemulonii* (1/87) e *Trichosporon inkin* (1/87), e apresentaram padrões de susceptibilidade variável frente às oito drogas testadas, sendo micafungina o antifúngico que apresentou melhor resposta *in vitro*. Quanto a capacidade de formação de biofilmes, todos foram capazes de formar em diferentes intensidades com destaque para os isolados de *C. tropicalis* e *C. albicans*. Quanto ao tratamento dos biofilmes, fluconazol foi ineficaz no tratamento de *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, além das espécies emergentes *C. haemulonii* e *Kodamaea ohmeri*. Caposfungina apresentou uma atividade frente aos biofilmes das espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. haemulonii* e *Cryptococcus neoformans*. Para ação da anfotericina B e cumarina podemos constatar a eficácia destes fármacos frente aos biofilmes de todas espécies testadas. Portanto, os dados encontrados neste estudo demonstraram que as espécies de *Candida* não - *C. albicans* apresentam-se como importantes agentes etiológicos de leveduroses sistêmicas superando o isolamento de *Candida albicans*. A identificação polifásica divergiu entre algumas espécies, sendo o Maldi TOF MS a ferramenta mais eficaz na caracterização taxonômica. Todos os gêneros estudados são capazes de formar biofilmes e a anfotericina B e cumarina são potentes agentes nos tratamentos de biofilmes de leveduras, entretanto, a cumarina apresenta menos efeitos citotóxicos. Portanto, algumas revisões e estudos mais aprofundados são necessários, os quais serão essenciais para compreensão e para minimizar os impactos ocasionados por estas leveduras.

Palavras-chave: IRAS; Infecções Fúngicas; Leveduras; Virulência; Antifúngico; Cumarina.

ABSTRACT

The admission of patients to intensive care units (ICU) is considered a risk factor for the development of infections related to healthcare, especially those of fungal etiology. Susceptibility to this infection may increase in conditions such as neutropenia, mucosal damage, hematopoietic stem cell or solid tissue transplantation, immunosuppressive therapy, use of broad-spectrum antimicrobials, prolonged hospital stay, and use of a central venous catheter. In addition, the variation in virulence of yeast species from the *Candida*, *Cryptococcus* and *Trichosporon* genera can influence the development and severity of these infections. Thus, the aim of this study was to evaluate the virulence potential of clinical yeasts, regarding the formation and treatment of biofilms. Eighty-seven clinical isolates were obtained from 73 patients of both sexes, aged between 18 and 88 years, which were characterized by chromogen, automation (VITEK2) and by mass spectrometry technique, in addition to the evaluation of the antifungal susceptibility profile, production and treatment of biofilm. They were identified as: *Candida tropicalis* (24/87), *C. albicans* (23/87), *C. parapsilosis* (18/87), *C. glabrata* (13/87), *Cryptococcus neoformans* (4), *Kodamaea ohmeri* (02/ 87), *C. metapsilosis* (1/87), *C. haemulonii* (1/87) and *Trichosporon inkin* (1/87), and showed patterns of variable susceptibility to the eight drugs tested, with micafungin being the antifungal that showed the best response in vitro. As for the ability to form biofilms, all were able to form at different intensities with emphasis on the isolates of *C. tropicalis* and *C. albicans*. As for the treatment of biofilms, fluconazole was ineffective in the treatment of *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, in addition to the emerging species *C. haemulonii* and *Kodamaea ohmeri*. Caposfungin showed an activity against biofilms of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. haemulonii* and *Cryptococcus neoformans* species. For the action of amphotericin B and coumarin we can see the effectiveness of these drugs against the biofilms of all species tested. Therefore, the data found in this study showed that *Candida* species non - *C. albicans* are important etiological agents of systemic yeasts, overcoming the isolation of *Candida albicans*. Polyphase identification diverged among some species, with Maldi TOF MS being the most effective tool in taxonomic characterization. All genera studied are capable of forming biofilms and amphotericin B and coumarin are potent agents in yeast biofilm treatments; however, coumarin has less cytotoxic effects. Therefore, some revisions and more in-depth studies are needed, which will be essential for understanding and to minimize the impacts caused by these yeasts.

Keywords: HCAI; Fungal Infections; Yeasts; Virulence; Antifungal; Coumarin

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 – Amostra Clínicas de pacientes internos em Unidades de Terapia Intensiva de Hospitais terciários do Recife	46
Figura 2 – A- Presença de células de leveduras em amostra de sangue; B – Isolamento primário de hemocultura em meio DAS; C- Purificação do isolamento primário; D- Colônia central de <i>Candida</i> spp; E – Micrografia de <i>Candida albicans</i> com presença de micélio verdadeiro e leveduras; F - Micrografia de <i>C. tropicalis</i> com presença de leveduras globosas; G- Micrografia de <i>C. parapsilosis</i> com presença de leveduras e pseudohifas; H- Micrografia de <i>C. glabrata</i> com presença de leveduras ovais; I- Macroscopia de <i>Trichosporon</i> sp; J- Micrografia de <i>Trichosporon</i> sp com presença de leveduras artrosporadas; L- Macroscopia de <i>Cryptococcus</i> sp; M- Micrografia de <i>Cryptococcus</i> sp com presença de leveduras encapsulada.	47
Figura 3 – Distribuição do gênero e faixa etária de pacientes internos em Unidades de Terapia Intensiva de Hospitais terciários do Recife	48
Figura 4 – Identificação de leveduras obtidas de pacientes com leveduroses sistêmicas por meio CHROMÁgar	52
Figura 5 - Incidência das espécies de leveduras clínicas de pacientes com leveduroses sistêmicas, internados em Unidades de Terapia Intensiva	54
Figura 6 - Espécies identificadas a partir de 87 amostras clínicas de pacientes com leveduroses sistêmica, internados em Unidades de Terapia Intensiva	55
Figura 7 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de <i>Candida tropicalis</i> . Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie.	62
Figura 8 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> . Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie.	62
Figura 9 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de <i>Candida parapsilosis</i> . Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao	63

nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie.

Figura 10 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de *Candida glabrata*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie. 63

Figura 11 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie. 64

Figura 12 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de *Trichosporon inkin*, *kodamaea ohmeri*, *C. haemulonii* e *C. metapsilosis*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). 64

Figura 13 - Atividade oxidativa do tratamento de biofilme de leveduras clínicas com Fluconazol, Caspofungina, Anfotericina B e Cumarina. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante o tratamento do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Letras maiúsculas, minúsculas e repetidas indicam diferença significativa no tratamento do biofilme dentro de uma mesma espécie. 66

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1 - Novas propostas para complexos de espécies de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	23
Tabela 2 - Perfil epidemiológico dos 87 episódios de leveduroses sistêmicas em Unidade de Terapia Intensiva de Hospitais terciários do Recife	47
Tabela 3 - Identificação polifásica de isolados de leveduras oriundos de Unidades de Terapia Intensiva de Hospitais terciários do Recife	50
Tabela 4 - Perfil de susceptibilidade antifúngica frente às drogas comerciais/padrões de isolados clínicos de pacientes com leveduroses sistêmicas, internados em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais públicos do Recife -PE	59
Tabela 5 - Perfil de susceptibilidade antifúngicas frente às drogas padrões e da cumarina de leveduras melhores produtores de biofilmes	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
3.1 INFECÇÕES FÚNGICAS RELACIONADAS A SAÚDE EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI).....	17
3.2 LEVEDUROSES SISTÊMICAS.....	18
3.2.1 Gênero <i>Candida</i>.....	18
3.2.2 Gênero <i>Cryptococcus</i>.....	20
3.2.3.1 Complexo <i>Cryptococcus</i>	22
3.2.3 Gênero <i>Trichosporon</i>.....	23
3.2.4 Diagnóstico laboratorial de leveduroses.....	25
3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	27
3.3.1 Biofilme.....	28
3.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA (DROGAS PADRÃO)	31
3.4.1 Poliênicos	31
3.4.2 Triazólicos.....	32
3.4.3 Equinocandina	33
3.5 SUSCEPTIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE LEVEDUROSES INVANSIVA.....	35
3.6 CUMARINA.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	39
4.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO	39
4.3 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	40
4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS E DOS DISPOSITIVOS MÉDICO INVASIVOS	40
4.4.1 Realização do diagnóstico micológico e isolamento fúngico a partir das amostras clínicas e dos dispositivos médicos invasivos	40
4.4.2 Purificação dos isolados	40

4.5 Identificação dos isolados clínicos obtidos das amostras e dos instrumentos médico-invasivos	41
4.5.1 Identificação pelo método CHROMagar <i>Candida</i> (COL et al., 2009, MÍMICA et al., 2009)	41
4.5.2 Identificação automatizada pelo Vitek 2 Compact	41
4.5.3 Identificação morfofisiológica.....	41
4.5.4 Identificação por espectrometria de massa através do MALDI-TOF.....	42
4.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS.....	43
4.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO	44
4.8 TRATAMENTO DE BIOFILME FÚNGICO	44
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICAS	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 DIAGNÓSTICO DE LEVEDUROSES SISTÊMICAS E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICO.....	46
5.1.1 Abordagem polifásica para caracterização taxonômica dos isolados clínicos de leveduras.....	49
5.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA	56
5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO	62
5.4 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICAS DOS MELHORES ISOLADOS PRODUTORES DE BIOFILME FRENTE A DROGAS PADRÕES E DERIVADO SINTÉTICO DE CUMARINA	66
5.5 TRATAMENTO DE BIOFILME FÚNGICO	66
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) têm aumentado substancialmente, sobretudo as de etiologia fúngica e especialmente em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Essas infecções em sua maioria são causadas por espécies de leveduras incluindo as do gênero *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*, as quais estão envolvidas em diversos quadros clínicos e são responsáveis por infecções sistêmicas, por muitas vezes com curso clínico fatal (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013). As leveduroses representam a quarta causa mais comum de infecções oportunistas, constituindo uma condição grave com mortalidade atribuível em até 75% dos casos (MOLINA et al., 2012). Dentre as leveduras, as espécies de *Candida* são os agentes de etiologia fúngica mais frequentemente isolados e responsáveis por até 80% das infecções fúngicas relacionadas a assistências a saúde (BASSETI et al., 2017; SAENE et al., 2009).

Nas infecções por leveduras devem ser considerados o binômio parasita hospedeiro, ou seja, os fatores predisponentes, relacionados ao hospedeiro, além da patogenicidade e do potencial de virulência das espécies envolvidas. Desta forma, a expressão de fatores de virulência está fortemente relacionada à gravidade clínica dos pacientes e à presença de dispositivos invasivos como o uso de cateter venoso central, sonda vesical, ventilação mecânica, uso de imunossuppressores, período de internação prolongado, prescrição de antimicrobianos, bem como o próprio ambiente das UTI's, o qual favorecem uma seleção natural de microrganismos, e a colonização por espécies resistentes (BASSETTI, et al. 2017; VIEIRA et al., 2017). Neste sentido, a severidade das doenças de base e suas consequências no estado geral dos pacientes de UTIs, associada aos diversos graus de imunossupressão, tornam esses indivíduos mais susceptíveis a essas infecções, sobretudo por espécies de leveduras. O potencial de virulência dessas leveduras, se traduz a partir da capacidade deste microrganismo na adesão, infecção e promoção da doença localizada ou disseminada. Neste contexto, o evento inicial de adesão às células do hospedeiro é considerado a etapa inicial na patogênese das leveduroses (BENNETT, et al. 2018).

Ademais, espécies de leveduras possuem a habilidade de formar estruturas multicelulares conhecidas como biofilmes, os quais fortalecem a adesão aos tecidos infectados ou as superfícies inertes como dos dispositivos médico-invasivos, promovendo resistência aos tratamentos e recidivas (CAVALHEIRO et al, 2016; DORIA et al., 2016; VIVEK, et al.2015;). Biofilmes representam o mais prevalente tipo de crescimento microbiano na natureza e são cruciais para o desenvolvimento de infecções fúngicas, estando associados com alto nível de resistência aos antifúngicos e às defesas do hospedeiro. Infecções causadas por leveduras em grande parte estão relacionadas com a formação destas estruturas igualmente consideradas como fator de virulência (PIERCE, et al. 2015; TURAN et al. 2018). A formação ocorre em um processo sequencial que envolve aderência a um substrato e

adesão intercelular, proliferação de células, aumento da população do patógeno e indução da formação de estruturas invasivas (FANNING et al., 2012).

A exposição aos fatores de risco relacionados à candidemia pode ser controlada através da avaliação de fatores de virulência, bem como do perfil de susceptibilidade dos agentes etiológicos aos antifúngicos disponíveis no mercado, entretanto a presença de cepas resistentes tem dificultado a escolha do tratamento adequado, tornando essencial a busca por alternativas terapêuticas sintéticas ou naturais no combate as leveduroses (PAIS et al, 2016; ALASTRUEY-IZQUIERDO, et al. 2015; CLSI, 2012; CLSI, 2008;).

Desta forma as cumarinas são os compostos majoritários encontrados em vegetais do gênero *Pterocaulon*, sendo que a maioria apresenta em sua estrutura química o grupamento 6,7-metilenodioxí, o qual possui uma extensa variedade de efeitos biológicos incluindo anticoagulante, estrogênico, fotossensibilizante, anti-helmíntico, vasodilatador, moluscicida, sedativo, hipnótico, analgésico, hipotérmico, antioxidante e antitumoral, antifúngica e controle de biofilme de *Escherichia coli* (MORABITO et al., 2010; YANG, 2010; CHIMICHI et al., 2002; OJALA et al., 2000; JIMENEZ-OROZCO et al., 1999; RAJ et al., 1998; HOULT e PAYÁ, 1996; NOGUCHI et al., 1995; DEXEUS et al., 1990).

Assim, os ensaios e conhecimento acerca da produção dos biofilmes fúngicos permitirão direcionamento para novos tratamentos, minimizando os altos índices de morbimortalidade sobretudo em pacientes de UTI, viabilizando dados que servirão de alvo para pesquisas futuras com produtos sintéticos e/ou naturais com excelência antifúngica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de virulência de leveduras isoladas de amostras clínicas, quanto a formação e tratamento de biofilmes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diagnosticar leveduroses sistêmicas de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva;
- Avaliar a colonização por leveduras em dispositivos médicos invasivos obtidos dos pacientes internados em UTIs;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme fúngico pelos isolados de leveduras obtidas das amostras clínicas e de dispositivos médicos – invasivos;
- Quantificar a atividade dos biofilmes formados pelas leveduras obtidas de amostras clínicas;
- Estabelecer o perfil de susceptibilidade antifúngica *in vitro* de células de leveduras;
- Tratar os biofilmes formados frente às drogas padrões e ao derivado cumarínico.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 INFECÇÕES FÚNGICAS RELACIONADAS À SAÚDE EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI)

Nas últimas décadas, as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) têm se tornado frequente nas unidades de terapia intensiva em todo o mundo, apesar dos inúmeros avanços nas intervenções diagnósticas e terapêuticas. As IRAS são infecções adquiridas durante a hospitalização e que não estavam presentes e nem em período de incubação por ocasião da admissão do paciente, consistindo uma das mais frequentes e importantes complicações em pacientes internados em UTIs (BASSETTI et al., 2017). A presença de infecção em pacientes críticos apresenta desafios únicos, pois pode influenciar diretamente a morbimortalidade desses indivíduos (BASSETTI et al., 2017, 2014).

No Brasil, estima-se que as IRAS sejam responsáveis por aproximadamente cerca de 45.000 óbitos e por perdas anuais da ordem de bilhões de reais aos cofres públicos (ALMEIDA et al., 2012; PAPAS, 2012).

A UTI é uma área crítica, restrita, de extrema importância e destinada à internação de pacientes graves, que requerem atenção especializada de forma contínua e integrada, uso de materiais específicos e tecnologias necessárias ao diagnóstico preciso, monitorização e tratamento dos pacientes criticamente doentes. Tal setor constitui um nível de atendimento à saúde de alta complexidade no ambiente hospitalar, atuando de forma decisiva quando há instabilidade de órgãos e risco de morte ao paciente (DE SOUSA et al., 2016, 2014).

Segundo os dados do Ministério da Saúde, pacientes internados em UTIs têm de 5 a 10 vezes mais chances de contrair uma infecção e que, podem representar cerca de 20% do total das infecções em uma unidade hospitalar (COUTINHO et al., 2015).

Das diversas infecções prevalentes em UTIs, a infecção fúngica invasiva sempre foi considerada infrequente e pouco notificada, entretanto, nos últimos anos, tem se observado um aumento nessa notificação e incidência, podendo ser atrelado ao melhor conhecimento dessas infecções. Atualmente, as infecções fúngicas sistêmicas constituem um grande problema nessas unidades, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. As frequências relativas com as quais os fungos causam infecções estão diretamente relacionadas a intensidade da imunossupressão (BASSETTI et al., 2014, PERLROTH et al., 2007).

Os fungos podem sobreviver em ambientes extremos, mas apenas 150 a 200 das milhares de espécies de fungos são patogênicos para humanos. A incidência de infecções fúngicas sistêmicas é

muito maior em indivíduos com diminuição na imunidade celular e humoral, condições predisponentes como a presença de dispositivos invasivos, mediante a quebra das barreiras de defesas naturais; uso de antibioticoterapia de amplo espectro, sobretudo quando aplicada empiricamente; tempo prolongado de permanência hospitalar; falha nos processos de assistência aos pacientes, dificultando a implementação das medidas adequadas na prevenção e controle de infecções (MOLINA et al., 2012).

Uma característica compartilhada por todos os fungos causadores de infecções é o desconhecimento da equipe médica, dificuldade em estabelecer o diagnóstico, a vida parasitária e isolamento do agente etiológico. Estudos demonstram que o perfil epidemiológico dessas doenças tem mudado a cada ano, se tornando crescente o isolamento de espécies emergentes, sobretudo agentes de leveduroses sistêmicas (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2017).

3.2 LEVEDUROSES SISTÊMICAS

As infecções fúngicas relacionadas à saúde têm emergido consideravelmente desde a década de 80, e várias espécies de patogenicidade conhecidas e oportunistas vem sendo isolados em pacientes como potenciais agentes etiológicos para estas infecções, principalmente nas UTIs. Entre os fungos, destacam-se as leveduras predominantemente as dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* (PFALLER E DIEKEMA, 2007).

3.2.1. Gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* se apresentam como comensais em humanos, presente em diversos sítios corpóreos e amostras clínicas, tais como, orofaringe, cavidade bucal, pele, mucosa vaginal, secreções brônquicas, urina, fezes, entre outros. Sabe-se, que essas leveduras fazem parte da microbiota dos seres humanos, e que, infecções fúngicas sistêmicas causadas por tais microrganismos são consideradas micoses oportunistas, uma vez que, a cepa que coloniza, posteriormente, pode tornar-se patogênica. Além da limitação dos nutrientes, essas leveduras estabelecem uma relação de competição com as bactérias da microbiota, desta forma, exercem uma pressão seletiva, o que acarreta na diminuição dos microrganismos menos adaptados, resultando no equilíbrio entre as populações microbianas nos tecidos colonizados (PAM et al., 2012).

Nas alterações no sistema imunológico, ocorre um desequilíbrio entre os microrganismos comensais da microbiota, conduzindo a debilidade os quais podem causar infecções superficiais em pessoas saudáveis e, sistêmicas graves, em pacientes críticos. O estabelecimento das micoses está mais associado ao sistema imunológico debilitado do paciente do que com a virulência das leveduras. No ambiente hospitalar esses microrganismos são considerados oportunistas e responsáveis por cerca

de 80 a 90% das doenças fúngicas (COLOMBO et al., 2017; COLOMBO; GUIMARAES, 2003; HOBSON, 2003).

É interessante destacar que apesar de serem conhecidas mais de 200 espécies de *Candida*, cerca de 20 são reconhecidas como patógenos humanos. Os principais agentes de interesse médico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. No entanto, tem sido relatadas infecções superficiais e invasivas por espécies emergentes, como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvergensis*, *C. inconspicua*, *C. pseudorugosa*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* e mais recentemente *C. auris* (CLANCY et al., 2017, MCCARTY e PAPPAS, 2016, GONÇALVES et al., 2010, COLEMAN et al., 1998).

Esses microrganismos, por sua vez, podem ter patogenicidade e virulência definidas pela sua capacidade de causar e determinar a gravidade de uma doença, mediada por diversos fatores. Dentre eles podemos citar os fatores de virulência, como: aderência, produção de tubo germinativo, dimorfismo (formação de micélio), variação fenotípica, variação genotípica, formação de biofilme, produção de toxinas, produção de exoenzimas (proteínase e fosfolipase), entre outros e desse modo, tornam-se mais patogênicos (DORIA et al., 2015; BUTLER et al., 2009; SCHULZE; SONNEBORN, 2009).

O isolamento das espécies fúngicas varia de acordo com a região, onde na América do Norte a espécie mais isolada é *C. albicans* seguida de *C. glabrata*. Na Europa, Austrália, América Latina e Ásia as espécies mais isoladas são *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Na Índia, a maior prevalência é por *C. tropicalis* (XIAO et al., 2015). No Brasil, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilhermondii* e *C. lusitaniae* são as espécies de *Candida* não-*Candida albicans* mais frequentemente isoladas (MORENO-LOAIZA, et al. 2017; BASSETTI, et al. 2014; NUCCI; COLOMBO et al., 2002). Esse aumento considerável de espécies do gênero *Candida*, nos últimos anos tem sido relacionado às condições do parto, prematuridade e suas consequências, presença de dispositivos invasivos e uso de antibióticos de amplo espectro; porém, o maior e principal fator é a colonização prévia por estas leveduras (GIOLO; SVIDZINSKI, 2014; MIRANDA et al., 2012).

A caracterização dos agentes etiológicos auxilia no conhecimento da epidemiologia desta micose, uma vez que se pode detectar recorrência ou nova infecção por outra cepa. Os recursos laboratoriais utilizados para o diagnóstico das infecções fúngicas são indispensáveis. Contudo, não há protocolos padronizados que sejam reconhecidos e que possam oferecer subsídios capazes de prever precocemente o risco de infecções pela presença de leveduras detectadas em amostras clínicas, mesmo considerando a probabilidade de uma colonização evoluir para infecção de alta morbidade e mortalidade em determinados casos clínicos (CHONG et al., 2006; RANGEL-FRAUSTO et al., 1999). Neste contexto, as culturas resultantes de amostras, como: sangue, líquido

cefalorraquidiano, líquido sinovial, material de abscesso coletado de forma estéril ou qualquer outro espécime cirúrgico, são consideradas representativas para o diagnóstico de candidíase (PATEL et al., 2010).

O diagnóstico clínico, com base na sintomatologia e na anamnese do paciente, não é conclusivo, pois os sinais e sintomas na candidíase oportunista são inespecíficos. Febre e leucocitose seriam os principais indícios de fungemia, porém 20% dos pacientes não desenvolvem hipertermia e apenas 50% apresentam leucocitose. Além disso, mesmo na presença desses sinais não é possível afirmar ser uma infecção fúngica considerando-se a semelhança com os sinais de infecção bacteriana, o que favorece os altos índices de mortalidade (BASSETTI et al., 2017; MCCARTY e PAPPAS, 2016).

As taxas de mortalidade por candidíase sistêmica, permanecem inaceitavelmente altas nas últimas décadas. Estudos esclarecem estratégias preventivas para o controle da infecção que devem ser enfatizadas, incluindo a higienização das mãos, medidas preventivas na inserção e manutenção de dispositivos invasivos; e sobretudo, um adequado manejo terapêutico antifúngico (SUTCU et al., 2016; PFALLER e DIEKEMA, 2007).

Na América Latina, as taxas de mortalidade continuam a ser mais altas do que as observadas nos países do Hemisfério Norte, enfatizando a necessidade de melhoria nas práticas locais de manejo clínico da candidíase sistêmica e sua disseminação, incluindo o diagnóstico precoce, controle de fontes de infecção e terapia antifúngica específica (DOI et al., 2016).

É evidente uma clara mudança na epidemiologia e no manejo clínico da candidíase sistêmica em pacientes internados em UTI. Pesquisas em todo o mundo apontam que a taxa de mortalidade diminuiu com o conhecimento do patógeno e a condução de uma terapêutica adequada (SILVA et al., 2015; COLOMBO et al., 2014).

3.2.2 Gênero *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* é caracterizado por leveduras que apresentam cápsula mucopolissacarídica envolvendo a parede celular, raramente produzem pseudo-hifa ou hifa septada, apresentam reprodução assexuada por brotação, não fermentam carboidratos e realizam hidrólise da ureia. Em culturas exibem colônias mucóides, lisas, de coloração branca a creme (ZARAGOSA et al., 2009; BARNETT, 2000).

Até 1950, a criptococose foi considerada uma micose causada por uma única e homogênea espécie, *C. neoformans*. Contudo, estudos envolvendo polissacarídeos capsulares revelaram a existência de isolados com epítomos capsulares distintos, designados A, B, C e D. Cruzamentos laboratoriais realizados entre indivíduos de mesmo sorotipo revelaram que indivíduos de sorotipos A e D produziam basidiósporos esféricos, enquanto aqueles de sorotipos B e C produziam meiosporos

ovoides ou baciliformes. Baseando-se nesta diferença morfológica, atribuiu-se o nome *C. neoformans* (teleomorfo: *Filobasidiella neoformans*) para indivíduos de sorotipos A e D e *C. gattii* (teleomorfo: *Filobasidiella bacillispora*) para indivíduos de sorotipos B e C (KWON-CHUNG et al., 2002).

Estudos moleculares e filogenéticos envolvendo cepas de sorotipo A e D, mostraram que isolados de sorotipos distintos se agrupavam separadamente. Então, novas variedades, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*, foram propostas para acomodar cepas do sorotipo A e D, respectivamente (KWON-CHUNG E VARMA., 2006; COGLIATI et al., 2000; FRANZOT et al., 1999).

A criptococose é uma doença infecciosa com distribuição mundial e com grande variedade de apresentações clínicas causadas por leveduras encapsuladas patogênicas do gênero *Cryptococcus*. As espécies consideradas mais frequentes que comumente causam doenças em humanos são *C. neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans* foi identificada pela primeira vez como um patógeno humano no final do século 19, mas não foi reconhecido como uma causa comum de doença humana até o final da década de 1970. (ARENDRUP et al. 2014). Nas últimas décadas, conforme as populações vulneráveis se expandiram, a meningite criptocócica se tornou uma infecção de importância global, com até um milhão de novas infecções por ano e de significativa morbidade e mortalidade atribuíveis, especialmente aos pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e AIDS (ARENDRUP. et al. 2014; NUCCI et al., 2010).

A criptococose por *C. neoformans* é a terceira infecção fúngica oportunista mais comum na América Latina (NUCCI et al., 2010) e os fatores predisponentes para esta doença estão associados a deficiência no sistema imunológico incluindo tratamentos com corticosteróides, transplante de órgãos, câncer, diabetes, linfocitopenia CD4⁺ idiopática e sarcoidose. Embora a maioria dos pacientes com criptococose disseminada sejam imunocomprometidos, *C. neoformans* também causa doença em indivíduos aparentemente saudáveis (PERFECT, 2010).

A infecção por *Cryptococcus* se inicia com a inalação de células de leveduras desidratadas ou de basidiósporos, que por apresentarem dimensões reduzidas (1,5µm-3,5µm) atingem os alvéolos pulmonares. Assim, as vias respiratórias representam a principal porta de entrada (BRIZENDINE et al., 2011). Os propágulos de *Cryptococcus* interagem com fagócitos residentes nos pulmões, que irão internalizar as partículas infectantes através de fagocitose. Em indivíduos saudáveis, os fagócitos conseguem destruir os patógenos e iniciar a resposta imune adaptativa, que inclui a liberação de citocinas, ativação e recrutamento de outras células imunológicas e apresentação de antígenos (GIBSON; JOHNSTON, 2015).

Devido à natureza sub-clínica da infecção em indivíduos imunocompetentes, informações sobre resposta imune a *C. neoformans* são limitadas. Infecções por este patógeno são ocasionalmente identificadas através de exames médicos por outros sintomas ou condições. A resposta imune ideal

resulta na extinção completa da infecção. Contudo, há casos em que o patógeno fica restrito ao interior de granulomas estabelecendo uma infecção latente assintomática (ROSE et al., 2014; SHIBUYA et al., 2005).

Caso a infecção por *Cryptococcus* não seja contida a nível pulmonar, haverá disseminação para outros órgãos, principalmente para o sistema nervoso central existindo três mecanismos hipotéticos sobre a penetração das células de *Cryptococcus* sp., resultando em meningoencefalite. Acredita-se que os macrófagos atuem como “cavalos de Tróia” carregando o patógeno até o SNC sem que o sistema imunológico perceba. Esta hipótese é corroborada pela observação de que a depleção de macrófagos alveolares em ratos reduz significativamente a disseminação deste patógeno para o SNC (LIU et al., 2012; CHARLIER et al., 2009).

Embora o trato respiratório seja a porta de entrada, o SNC é o sítio mais acometido, pois *C. neoformans* apresenta neurotropismo causando meningite ou meningoencefalite em pacientes imunossuprimidos. Em indivíduos com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), este quadro clínico pode ser observado quando a contagem de linfócitos T CD4+ é inferior a 100 células/ μ L (HONG NGUYEN et al., 2010).

Lesões cutâneas por *C. neoformans* geralmente representam a disseminação do fungo por via linfática ou hematogênica e podem ser múltiplas ou isoladas, apresentando características variadas (pápulas, pústulas, vesículas, nódulos, úlceras), embora a aparência semelhante a molusco contagioso seja a mais relatada. Estas manifestações cutâneas são mais frequentes em pacientes infectados pelo sorotipo D (MARTINEZ et al., 2001 TORTORANO et al., 1997; DROMER et al., 1996).

3.2.3.1 Complexo *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus*, em seu conceito atual, contém as leveduras dimórficas *C. amyloletus*, *C. bacillisporus*, *C. decagattii*, *C. deneoformans*, *C. deuteroformans*, *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. tetragattii* (LIU., et al. 2015). Espécies filamentosas *C. depauperatus* e *C. luteus* (LIU., et al. 2015). Dados moleculares revelaram que os complexos de espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* eram inesperadamente geneticamente diversos (HAGEN et al., 2017). Com base em quatro genes, calculou-se que *C. neoformans* / *C. deneoformans* separados do complexo de espécies de *C. gattii* 37 milhões de anos atrás, *C. neoformans* e *C. deneoformans* separaram-se 18,5 milhões de anos atrás, e *C. gattii* e *C. bacillisporus* se separaram 9,5 milhões de anos atrás (KWON-CHUNG., 2017; XU et al . 2000).

Variações fenotípicas, ecológicas e geográficas também apoiam a criação de táxons em nível de espécie nos complexos de espécies *C. gattii* e *C. neoformans* (Tabela 1) (KWON-CHUNG., 2017; HAGEN et al., 2017). A proposta de dividir os dois agentes da criptococose em 7 haplóides e 4 espécies híbridas aneuplóides / diplóides merece ampla discussão antes da adoção. Como as sete

espécies novas não são reconhecidas como clinicamente distinguíveis, a adoção universal do novo sistema de nomenclatura deve ser adiada até que estudos mais detalhados empregando um maior número de isolados revelem a relevância clínica e biológica da nova espécie. A adoção da nomenclatura proposta nesta conjuntura poderia separar a taxonomia da prática clínica e, ao fazê-lo, inibir o progresso de ambos os campos. (KWON-CHUNG., 2017)

Tabela 1. Novas propostas para complexos de espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Nomenclatura atual	Tipos Moleculares	Nomenclatura sugerida
<i>C. neoformans</i>	VNI/VNII/VNB	<i>C. neoformans</i>
Var. <i>grubii</i>	(AFLP1, AFLP1A, AFLP1B, VNB)	
<i>C. neoformans</i>	/ VNIV (AFLP2)	<i>C. deneoformans</i>
Var. <i>neoformans</i>		
AD híbrido	VNIII (AFLP3)	<i>C. neoformans</i> × <i>C. deneoformans</i> híbrido
	VGI (AFLP4)	<i>C. gattii</i>
	VGII (AFLP6)	<i>C. deuterogattii</i>
<i>C. gattii</i>	VGIII (AFLP5)	<i>C. bacillisporus</i>
	VGIV (AFLP7)	<i>C. tetragattii</i>
	VGIV/VGIIIc (AFLP10)	<i>C. decagattii</i>
DB híbrido	AFLP8	<i>C. deneoformans</i> × <i>C. gattii</i> híbrido
AB híbrido	AFLP9	<i>C. neoformans</i> × <i>C. gattii</i> híbrido
AB híbrido	AFLP11	<i>C. neoformans</i> × <i>C. deuterogattii</i> híbrido

Fonte: KWON-CHUNG., 2017

3.2.3 Gênero *Trichosporon*

As espécies de *Trichosporon* são leveduras basidiomicetos, não encapsuladas, urease-positivas, sem estado sexual conhecido. São amplamente distribuídas no ambiente e regularmente encontradas na microbiota da pele, particularmente nas áreas peri-genitais, e ocasionalmente como parte normal do trato gastrointestinal ou parte superior do trato respiratório (MICELI et al 2011;

COLOMBO et al., 2011). A característica morfológica mais marcante é a formação de blastoconídios em forma de cilindro, além de pseudo-hifas, hifas septadas (COLOMBO et al., 2011).

O gênero *Trichosporon* passou por ampla reavaliação taxonômica, sendo hoje composto por 37 espécies (MARTY *et al.*, 2003). No entanto, apenas 16 espécies foram associadas à infecção humana (COLOMBO et al., 2011). A maioria das infecções são causada por *Trichosporon asahii* (74%), seguido por *T. dermatis* (12%) (RUAN et al., 2009). Em humanos, tem sido associado a pneumonia por hipersensibilidade e piedra branca, particularmente em climas quentes e úmidos. No hospedeiro imunocomprometido, infecções invasivas como fungemia, endocardite, peritonite e meningite também foram relatadas. Os fatores de risco mais comuns para infecções invasivas são doença hematológica maligna subjacente com neutropenia de longa duração (RUAN et al., 2009; GIRMENIA et al 2005; FOURNIER et al., 2002) ou disfunção de neutrófilos, como doença granulomatosa crônica (WYNNE et al., 2004). A infecção progride rapidamente e pode ocorrer falência de múltiplos órgãos, como pulmões, rins e cardiovasculares, sendo as lesões cutâneas um provável sinal de infecção disseminada (KONTOYIANNIS et al., 2004; ROJAS; MAGDALENA, 2004). Os homens, são os que mais frequentemente contraem a infecção e os fatores predisponentes são a presença de cateter venoso central, permanência na UTI, diálise peritoneal, uso de corticoesteroides e quimioterapia citotóxica (COLOMBO et al., 2011; RUAN et al., 2009; GIRMENIA et al 2005; KONTOYIANNIS et al., 2004). A taxa de mortalidade é alta, variando de 60% a 80% (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008).

Trichosporonose é uma infecção fúngica invasiva rara, mas frequentemente fatal em pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles com malignidades hematológicas. No entanto, durante as duas últimas décadas essa levedura emergiu como importante patógeno oportunista (GUEHO *et al.*, 1994). Embora trichosporonose represente uma pequena porcentagem de todas as infecções fúngicas invasivas, espécies de *Trichosporon* têm sido relatadas como a segunda ou terceira levedura mais comum em casos de fungemia (FOURNIER et al., 2002). Essas infecções têm se tornado frequentes em pacientes com doenças hematológicas malignas, queimaduras extensas, tumores sólidos e aids, representando cerca de 10% de todos os casos confirmados de micoses disseminadas (WALSH et al., 1990).

O diagnóstico dessa infecção invasiva está baseado na microscopia direta (para a detecção de estruturas fúngicas na vida parasitária) e cultura. Espécies de *Trichosporon* compartilham antígenos com *Cryptococcus* e *Aspergillus* e um número de relatórios demonstraram reação cruzada para o antígeno criptocócico e/ou kits de antígeno galactomanano (LIAO et al 2012; FEKKAR et al., 2009; LYMAN et al 1995; MELCHER et al 1995; MCMANU et al., 1985; CAMPBELL et al., 1985). Testes moleculares, incluindo detecção direta em amostras de sangue ou amostras de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, estão sendo desenvolvidos, mas ainda não estão padronizados

(SHINOZAKI et al., 2013; HOSOKI et al., 2008). A identificação confiável de espécies requer identificação molecular com sequenciamento do ITS 1 + 2 (domínio D1 / D2) ou mesmo da região intergênica espaçadora (IGS1) do rDNA e o MALDI-TOF-MS é uma ferramenta de identificação promissora (com um extenso banco de dados) (ARENDRUP et al., 2017). A identificação adequada do agente etiológico favorece a escolha do tratamento específico.

Os azóis são a classe farmacológica primária para o tratamento de tricosporonoses invasiva (SUZUKI et al., 2010; RUAN et al., 2009; MATSUE et al., 2006; ASADA et al., 2006; SERENA et al., 2006). Várias das espécies são resistentes *in vitro* à anfotericina B com (CIMs > 2 mg/L) e às equinocandinas (CIMs > 16 mg/L) (CHAGAS-NETO et al., 2009). Em doentes com tricosporonose sistêmica e doença hematológica subjacente foram notificadas taxas de resposta insatisfatória (entre 16% e 24%) à anfotericina B e, por conseguinte, esta formulação não é recomendado para infecções invasivas por essa levedura (GIRMENIA et al 2005; FOURNIER et al., 2002, MARTY et al., 2003; WALSH et al., 1990; HOY et al., 1986). Triazóis, por outro lado, foram encontrados ser superior a outras classes de medicamentos antifúngicos na profilaxia e tratamento (RUAN et al., 2009). A maior parte da experiência publicada diz respeito ao uso de fluconazol. No entanto, variações na suscetibilidade *in vitro* podem sugerir que nem todas as espécies e isolados são igualmente suscetíveis a esse agente (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). O voriconazol é o agente de escolha por apresentar boa atividade *in vitro* contra a maioria das espécies e isolados de *Trichosporon* e tem sido associado com bons resultados *in vivo* na maioria dos casos de estudos clínicos com animais (RUAN et al., 2009; FOURNIER et al., 2002) Além do tratamento com triazol, a resolução da mielossupressão e a remoção de cateteres vasculares são outros fatores relacionados à sobrevida aumentada (CHITASOMBA et al., 2012; MATSUE et al., 2006; ASADA et al., 2006; GIRMENIA et al 2005).

As terapêuticas são eficazes quando a doença é detectada na fase inicial, sendo, portanto, o diagnóstico precoce um fator importante para o sucesso na gestão de pacientes com tricosporonose. No entanto, dificuldades na identificação desses microrganismos conduzem a tratamentos tardios, sendo muitas vezes o diagnóstico é realizado pós-morte (MORETTI-BRANCHINI *et al.*, 2001).

3.2.4 Diagnóstico laboratorial de leveduroses

O diagnóstico laboratorial das leveduroses se baseia na observação da estrutura fúngica em parasitismo através da análise microscópica direta da amostra biológica e na obtenção do agente etiológico em meios de cultura específicos (OLIVEIRA, 2014; KAUFFMAN et al., 2011).

De acordo com consenso Europeu para pesquisa e tratamento de câncer (EORTC/MSG), são atribuídos três níveis de probabilidade para o diagnóstico de infecção invasiva por fungos que acometem pacientes imunossuprimidos, são elas: infecção comprovada, quando existe a demonstração de estruturas

fúngicas nos tecidos; infecção possível, quando o somatório de fatores do paciente, história clínica, imagem e exames micológicos corroboram o diagnóstico; e provável infecção, quando fatores do paciente, história clínica e imagem indicam micose, mas não há observação de estruturas fúngicas típicas ao exame direto e isolamento do agente etiológico. (DE PAUW *et al.*, 2008).

Neste sentido, para realização do diagnóstico laboratorial micológico se faz necessário que seja realizado a partir de amostras clínicas estéreis como sangue e líquido, ou outras amostras como: urina, escarro, fezes, fluidos diversos, fragmentos de tecidos, entre outros (OLIVEIRA, 2014). Esta análise pode ser realizada a fresco, com ou sem adição de corante, clarificante ou contrastante, a depender do material biológico (ANVISA, 2013). O exame microscópico direto é considerado o método mais rápido e menos oneroso na realização do diagnóstico laboratorial micológico (MURRAY *et al.*, 2012).

Os fungos, em sua maioria, não são exigentes em suas necessidades nutricionais e facilmente desenvolvem-se em diferentes meios de cultura sintéticos facilitando seu isolamento em diferentes condições de incubação (KAUFFMAN, 2011). Na rotina laboratorial, utiliza-se Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia®) que é um meio não seletivo para cultura e manutenção de fungos patogênicos e não patogênicos. A seletividade é obtida através do uso de aditivos, como carboidratos e antibióticos (PAPPAS *et al.*, 2016).

Entretanto para identificação do agente etiológico são utilizadas ferramentas diversas que avaliam as características morfológicas, bioquímicas e moleculares desses microrganismos, como: auxanograma, zimograma, meios de cultura cromogênicos, métodos sorológicos, biologia molecular e proteômica (MIMICA *et al.*, 2009; RESENDE *et al.*, 2004; LACAZ *et al.*, 2002)

O auxanograma e zimograma são provas onde são observadas a assimilação e fermentação das fontes de carbono respectivamente e fazem parte dos métodos fenotípicos tradicionais para a identificação de leveduras usadas em laboratórios do mundo todo, considerados métodos clássicos e padrão ouro para essa finalidade, entretanto sistemas automatizados ou semiautomatizados como VITEK® 2 e BD PHOENIX, tem substituído essas técnicas tendo em vista que são mais rápidos, contudo, são mais onerosos (VALENZA *et al.*, 2008; SANGUINETTI *et al.*, 2006).

Os meios de cultura cromogênicos surgem como uma alternativa a auxiliar na triagem de leveduras patogênicas, diferenciando as colônias conforme a cor produzida e facilitando a detecção de culturas mistas. Essa ferramenta pode também ser utilizada com o intuito de fornecer preliminarmente um laudo rápido para equipe médica, para que a intervenção terapêutica seja imediata. Já Os métodos sorológicos, são avaliadas a presença de antígenos ou anticorpos anti-*Candida* no soro, e também detectam constituintes da parede celular da levedura como manose e 1-3-β-D-Glucan (MIMICA *et al.*, 2009; OBAYASHI *et al.*, 1995).

No entanto, devido às limitações decorrentes do uso das técnicas diagnósticas tradicionais, são necessárias ferramentas mais sensíveis, precisas e confiáveis. Nesse sentido, surgem as técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e Maldi TOF MS.

A PCR é a técnica mais utilizada para este fim, pois através da amplificação do material genético permite rápida identificação dos fungos. Já para fins epidemiológicos, é utilizada a técnica RAPD, por esse método de genotipagem pode-se analisar a similaridade entre isolados clínicos e se microrganismos da mesma espécie são iguais, similares ou diferentes, discriminando subpopulações intraespécies, esse ensaio utiliza uma sequência pequena (nove a 10 pares de bases) como primers aleatórios para a amplificação do DNA. Essa variação da PCR permite avaliar a correlação genética entre isolados da mesma espécie (KANBE et al, 2002; LEHMANN et al, 1992).

O MALDI-TOF tem sido utilizado com sucesso na investigação e identificação de proteínas e peptídeos, na identificação taxonômica de microrganismos, na genotipagem e análise de polimorfismos no DNA, na investigação de modificações pós-transcricionais no RNA, dentre inúmeras outras aplicações. A técnica é baseada ionização por dessorção de moléculas as quais são avaliadas pela relação carga/massa, e através da identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados, resultado na identificação das espécies (CROXATTO et al, 2012; MARVIN et al 2003).

Por se tratar de uma técnica de alta sensibilidade e de alto rendimento (uma amostra pode ser analisada em poucos minutos), novas abordagens vêm sendo desenvolvidas para atender a necessidade de diagnósticos rápidos e precisos para diversas doenças, como o MALDI-IMS, que permite a análise direta de uma secção de um tecido qualquer sem danificá-lo, facilitando a correlação direta dos dados de espectrometria de massas com as características morfológicas do tecido (CHO et al 2013; BALLUFF et al 2011).

3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

A capacidade dos fungos causarem infecções está associada a alguns fatores de virulência, os quais são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a certas condições, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Essas condições são específicas para cada microrganismo e podem variar intra e interespecificamente (LACAZ et al., 2002).

Durante algumas décadas acreditava-se que as leveduras participavam passivamente do processo de patogênese das infecções fúngicas. Assim, a debilidade orgânica ou imune do hospedeiro era considerada único mecanismo responsável para o estabelecimento da infecção oportunista. Esse conceito vem sendo modificado, e assim há consenso que esses microrganismos participam

ativamente do processo fisiopatogênico da doença, utilizando-se de mecanismos de agressão denominados de fatores de virulência (TAMURA et al., 2007).

A patogênese da doença fúngicas invasiva é facilitada por um número expressivo de fatores de virulência, como a capacidade do fungo em se aderir as células hospedeiras, a formação de biofilme, a secreção de enzimas hidrolíticas, incluído proteases, fosfolipases, lipases, produção de capsula polissacarídea, melanina entre outras. Assim a detecção de tais fatores contribui para prevenção, para o diagnóstico e tratamento. No entanto, algumas espécies de leveduras têm dados insipientes quanto ao potencial de virulência e patogenicidade, sobretudo acerca da formação de biofilme (TAMURA et al., 2007).

3.3.1 Biofilme

Estudos têm observado que os microrganismos praticamente não existem na sua forma livre ou planctônica, nos tecidos do hospedeiro, mas se agrupam formando uma comunidade multicelular, denominada biofilme, tanto sob os tecidos quanto em material médico invasivo e outras superfícies. Os biofilmes representam o tipo mais prevalente de crescimento microbiano na natureza e são importantes para o desenvolvimento e continuidade das infecções fúngicas, estando associados com alto nível de resistência aos antifúngicos e às defesas do hospedeiro. (SOLL, 2008; DOUGLAS, 2004; KUHN et al., 2002; RAMAGE et al., 2001).

O contato da levedura com o substrato, estabelece inúmeras interações físico-químicas tornando possível a adesão inicial do microrganismo a esta superfície. Ao ocorrer a completa adesão, o biofilme sofre um processo de maturação. Em um biofilme maduro coexistem muitas microcolônias, constituídas por distintas espécies de leveduras, que são envolvidas por uma matriz extracelular na qual ocorre a passagem de água e nutrientes. Os biofilmes maduros, com um crescimento de 24 a 48 horas, consistem em uma rede densa de células sob a forma de leveduras, de hifas e pseudo-hifas, a depender da espécie fúngica (DOUGLAS, 2004).

A matriz extracelular, produzida por células sésseis, é uma das características mais importante de um biofilme que influencia na virulência das espécies de leveduras, possui aspecto tridimensional e hidratado. Em geral a matriz do biofilme compreende hidratos de carbono, proteínas, fósforo e hexosaminas. No entanto, fatores ambientais como composição e pH do meio, disponibilidade de oxigênio, bem como a linhagem de fungos podem interferir na formação e composição da matriz, a exemplo dos biofilmes de *Candida parapsilosis* que contêm grandes quantidades de hidratos de carbono e apresentam baixo teor de proteínas, quando comparado com agregados de *C. glabrata* e *C. tropicalis* (MATHÉ e VAN DIJCK 2013; DA SILVA et al. 2012; AL-FATTANI e DOUGLAS 2006; BLANKENSHIP e MITCHELL 2006; DOUGLAS 2004).

A presença da matriz extracelular, não é um fator isolado, outras características associadas, como taxa de crescimento das células, expressão de genes que conferem resistência ou presença de células persistentes que são capazes de escapar à ação de antifúngicos e reconstituir novamente o biofilme, determinam um fenômeno multifatorial para o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos (MATHÉ e VAN DIJCK 2013; TAFF et al. 2013; MARTINEZ e FRIES 2010; UPPULURI et al. 2009).

Biofilmes formados por leveduras representam um problema clínico crescente e está associado a taxas significativamente altas de mortalidade. *Candida albicans* é o agente mais relatado como formador de biofilme fúngico, no entanto, outros gêneros como *Cryptococcus* sp. e *Trichosporon* sp. mostraram estar implicados em infecções associadas ao biofilme. Ainda, a persistência deste fator de virulência à terapia antifúngica continua sendo a maior ameaça aos pacientes com biofilmes (RAMAGE et al., 2009).

O gênero *Cryptococcus*, que compreende leveduras oportunistas encapsulada, demonstram a capacidade de colonizar e subsequentemente formar biofilmes em derivações ventriculares, fístulas de diálise peritoneal e válvulas cardíacas, sendo cápsula polissacarídeo o aporte principal de carboidrato desses biofilmes (MARTINEZ & CASADEVALL 2006). Espécies de *Trichosporon* também tem sido associadas a infecções relacionadas a implantes médicos, incluindo cateteres, implantes mamários e enxertos cardíacos, com formação biofilmes, o que tem elevado a virulência dessas espécies no processo infeccioso (KRZOSSOK et al. 2004).

O Gênero *Candida* é conhecido por construir biofilmes altamente estruturados e dinâmicos compreendendo várias formas morfológicas (leveduras, pseudo-hifas e hifas). As leveduras pertencentes a esse gênero expressam diversos fatores de virulência que diferem das características comensais e que conferem a capacidade de colonizar e invadir o tecido do hospedeiro. Neste grupo de fungos, a formação de biofilme pode ser dividida em quatro etapas principais: adesão, proliferação, maturação e dispersão (Figura 1) (LOHSE et al., 2018, WALL et al., 2019).

Na fase de adesão, as células de levedura aderem a uma superfície e formam uma camada basal que irá ancorar o biofilme. (FOX et al., 2015, ALIM et al., 2018).

Após a fase adesão a fase de proliferação celular, é caracterizada pelo início da filamentação ou multiplicação das células de leveduras, levando ao surgimento de uma rede a qual é responsável pela estruturação geral dos biofilmes. A capacidade de algumas leveduras em formar hifas, bem como a aderência dessas hifas umas às outras e a outras células, é essencial para o desenvolvimento dos canais de manutenções do biofilme (NOBILE et al., 2015).

Na fase de maturação; há a produção da matriz extracelular (mix de glicoproteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos) que atuam essencialmente como um adesivo, quem tem por finalidade sustentar toda arquitetura do biofilme formado, bem como, conferir uma proteção adicional

às células de leveduras. Mais de 500 proteínas presente na matriz extracelular já foram identificadas, sobretudo enzimas, como as enzimas de hidrólise, sugerindo que a matriz pode desempenhar um papel ativo na quebra de biopolímeros (LOHSE et al., 2018). Outro componente presente nessas matrizes é o β -1,3 glucano, o qual é responsável por favorecer a resistência contra os azóis por meio de sequestro da droga (NETT et al., 2010).

A etapa de dispersão ocorre pela liberação de células de leveduras da estrutura do biofilme, que pode resultar na formação de novos biofilmes ou propagar para outros tecidos do hospedeiro. (FINKEL e MITCHELL 2011).

Durante a formação do biofilme de leveduras, ocorre um sistema de comunicação intercelular conhecido como *quorum sensing*, que modula o desenvolvimento, permitindo crescimento e dispersão das células de leveduras (MARTINEZ & FRIES 2010; HOGAN 2006). Algumas moléculas deste sistema de comunicação, como tirosol e farnesol, são importantes na formação do biofilme. Enquanto tirosol promove a formação de hifas e biomassa na fase inicial do biofilme, o farnesol inibe a formação de hifas, impedindo o crescimento do biofilme e permitindo a dispersão das células para outros locais anatômicos no hospedeiro humano (COSTA et al. 2013; FINKEL & MITCHELL 2011; MARTINEZ & FRIES 2010; RAMAGE et al. 2009).

Os mecanismos de formação de biofilme são similares entre as espécies de leveduras. No entanto, algumas características específicas de acordo com a levedura envolvida, como morfologia celular, tipos de substrato e fontes de nutrientes podem ser observadas (COSTA et al. 2013). Biofilme de *C. glabrata* formado em superfície de silicone quando na presença de urina produz uma biomassa mais intensa comparado com biofilme de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, entretanto na presença de caldo Sabouraud dextrose, observa-se um escasso desenvolvimento do biofilme de *C. glabrata* comparado às outras espécies (SILVA et al. 2010; SILVA et al. 2009). Em meios com altas concentrações de lipídios e glicose *C. parapsilosis* facilmente consegue formar biofilme (NOSEK et al. 2009). A formação de biofilme de *C. albicans* pode ocorrer na superfície de qualquer material médico hospitalar, enquanto o de *C. tropicalis* ocorre principalmente em cateter de látex e de silicone (NEGRI et al., 2010; SILVA et al., 2009).

A geração de biofilme por *C. albicans* está associado com a troca dimórfica de crescimento de levedura para hifas, sendo a estrutura do biofilme formado por duas camadas distintas: uma camada fina de levedura basal e uma camada mais densa de hifa (BAILLIE et al., 1999). Em contraste, as estirpes de *C. parapsilosis* produzem um biofilme quantitativamente menor e estruturalmente menos complexo que os de *C. albicans* (KUHN et al., 2002). A formação do biofilme é precedida pela aderência aos tecidos ou dispositivos médicos, resultando em uma mudança na morfologia e comportamento do microrganismo. Os biofilmes de *C. parapsilosis* podem ocorrer em diversos

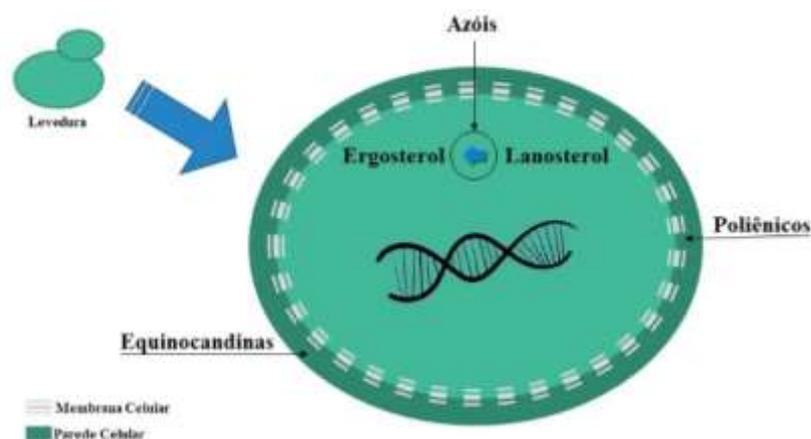
dispositivos médicos, incluindo cateter de acesso central e outros dispositivos invasivos, filtros e tubulações de hemodiálise, próteses intracardíacas e articulações protéticas (RAMAGE et al 2009).

Na ausência de anticorpos específicos, a matriz do biofilme bloqueia a ativação do complemento, ao passo que se os anticorpos estiverem presentes, a matriz polimérica, geralmente os torna ineficazes. Tem sido demonstrado que a matriz do biofilme também é capaz de inibir a quimiotaxia e degranulação de polimorfonucleares e macrófagos, sendo também capaz de deprimir a resposta linfoproliferativa de monócitos ativadores policlonais (MAH O'TOOLE, 2001).

Existem muitos dados que demonstram a resistência antifúngica de espécies de *Candida* formadoras de biofilme (D'ENFERT 2006). Apesar de sua estrutura menos complexa, biofilmes de *C. parapsilosis* também apresentam resistência aos antifúngicos convencionais como anfotericina B e os compostos azólicos, semelhante aos biofilmes de *C. albicans* (KATRAGKOU et al., 2007; RUZICKA et al 2007).

3.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA (DROGAS PADRÃO)

Atualmente, três grupos principais de antifúngicos têm sido utilizados na prática clínica no manejo de infecções sistêmicas por espécies de *Candida*: a) os poliênicos, representados principalmente pela anfotericina B e suas formulações lipídicas; b) os triazólicos, sendo seus principais agentes o fluconazol e voriconazol; e c) as equinocandinas, representadas pela caspofungina, anidulaungina e micafungina (PAPPAS et al., 2012).



Fonte: SANTOS, et al 2018

3.4.1 Poliênicos

As drogas poliênicas pertencem a uma classe de antifúngicos naturais produzidos por espécies de *Streptomyces*, tendo como principal representante a anfotericina B. Devido ao amplo espectro de

ação (leveduras, fungos filamentosos e dimórficos) e à sua atividade fungicida, a anfotericina B ainda é considerada o antifúngico de primeira linha para o tratamento de diversas infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados (PAPPAS et al., 2012; WALSH et al., 2008). A anfotericina B se liga de maneira irreversível ao ergosterol da membrana citoplasmática dos fungos, resultando na formação de poros e, posteriormente, na lise da célula fúngica (ODDS et al., 2003).

Entre os isolados de *Candida*, a ocorrência de resistência secundária à anfotericina B ainda é considerada pouco frequente (PFALLER et al., 2010; DA MATTA et al., 2007; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Contudo, alguns casos de resistência à terapia com este fármaco têm sido documentados (KROGH-MADSEN et al., 2006; NOLTE et al., 1997). A espécie de *Candida* com maior documentação em relação à resistência é *C. lusitaniae*. Apesar dos estudos mostrarem que isolados de *C. lusitaniae* apresentam baixa frequência de resistência “*in vitro*” (PFALLER et al., 2010; CHEN et al., 2009; ZAOUTIS et al., 2005). Ainda, espécies de *Trichosporon* também tem sido relatada como resistentes ao tratamento com Anfotericina B (ARENDRUP et al., 2014).

Embora seja considerada um antifúngico de amplo espectro de atividade, a anfotericina B apresenta alta toxicidade para o hospedeiro. A nefrotoxicidade é o principal efeito colateral ocasionado pelo uso deste fármaco, fator que tem limitado sua utilização clínica (PAPPAS et al., 2009; PASQUALOTTO, 2008). Com o objetivo de diminuir a toxicidade da formulação convencional da anfotericina B, diversas formulações lipídicas deste composto (lipossomal, complexo lipídico, dispersão coloidal, intralipídica e conjugada) encontram-se disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas invasivas, apresentando menor toxicidade quando comparadas à anfotericina B desoxicolato (PFALLER et al., 2010). Entretanto a grande maioria dos hospitais públicos brasileiros, devido ao alto custo das demais formulações, tem à sua disposição apenas a anfotericina B desoxicolato para tratamento das infecções fúngicas invasivas. (ARENDRUP et al., 2014) Outros fármacos também são utilizados no tratamento de fungemia, como os triazólicos, os quais apesar de exibirem menores efeitos colaterais vêm apresentando o desenvolvimento de graus variados de resistência. (ARENDRUP et al., 2014)

3.4.2 Triazólicos

Os triazólicos são antifúngicos sintéticos, constituindo a maior classe de agentes antifúngicos. O mecanismo de ação dos triazólicos ocorre pela inibição da atividade da enzima 14- α -lanosterol-demetilase (codificada pelo gene Erg11), responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, componente fundamental à integridade da membrana celular de células fúngicas (ODDS et al., 2003). Ao contrário da anfotericina B, a atividade dos triazólicos contra espécies de *Candida* é fungistática (PFALLER et al., 2010).

Entre os triazólicos, fluconazol e voriconazol são atualmente os únicos compostos empregados na terapia das infecções da corrente sanguínea por *Candida*, sendo também considerada a terapia padrão para o tratamento de candidíase orofaríngea, esofágica e vaginal (PAPPAS et al., 2009). Em infecções por espécies de *Cryptococcus*, fluconazol mostra uma alta eficácia para o tratamento (MALIK et al., 1998), apresentando como vantagem, menores índices de toxicidade quando comparado à anfotericina B. (ARENDRUP et al., 2014)

De forma geral, a resistência de *Candida* ao fluconazol é relativamente baixa entre os isolados de corrente sanguínea, porém sua ocorrência tem aumentado nas últimas décadas (PFALLER et al, 2010; PFALLER; DIEKEMA, 2007;). Em uma revisão de Pfaller et al. (2007) foram analisados os resultados de testes de sensibilidade ao fluconazol de 13.338 amostras de *Candida*. Nesta pesquisa, foi observada que a resistência ao fluconazol entre esses isolados está representada principalmente por *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais apresentaram resistência em 9% e 40% dos isolados, respectivamente. (ARENDRUP et al., 2014)

Uma nova geração de triazólicos, entre eles o voriconazol e posaconazol, foi desenvolvida a partir de modificações químicas introduzidas nas moléculas do fluconazol e itraconazol, respectivamente. O voriconazol e posaconazol são os principais representantes desta segunda geração dos azólicos, apresentando atividade antifúngica contra as diferentes espécies de *Candida*, *Trichosporon* e *Cryptococcus*, incluindo isolados intrinsecamente resistentes ao fluconazol, como *Candida glabrata* e *C. krusei* (ARENDRUP et al., 2014; PFALLER et al, 2010; GUINEA et al., 2008; PFALLER et al, 2006; SABATELLI et al., 2006).

3.4.3 Equinocandinas

As equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Três drogas - caspofungina, anidulafungina e micafungina - chegaram à fase de investigação clínica. Destas, a primeira licenciada para uso clínico foi a caspofungina, comercialmente denominada Cancidas®. Diferentemente da anfotericina B e dos azólicos, as equinocandinas têm como alvo a parede celular, inibindo a enzima ligada à síntese de β -(1,3)-D-glucana (ESTES et al, 2009; DERESINSKI; STEVENS, 2003). Equinocandinas agem *in vitro* sobre diversas leveduras e fungos filamentosos, porém em infecções experimentais é relevante somente sua atividade sobre espécies de *Candida* e de *Aspergillus*. Para este último agente, ela é apenas fungistática (MORACE et al, 2009; DIAKEMA et al., 2002; ESPINEL-INGROFF, 1998;). Espécies de *Cryptococcus* e *Trichosporon* são intrinsecamente resistentes à essa classe de antifúngico (ARENDRUP et al., 2014)

Os efeitos adversos são menos frequentes comparados a anfotericina B e a interação com outros medicamentos é menor do que com as drogas azólicas. Contudo, a administração exclusivamente endovenosa e o restrito espectro de ação limitam o uso clínico das equinocandinas, e mais especificamente da caspofungina, a infecções mais graves por *Candida*, como nos casos de candidemia. (ARENDRUP et al., 2014)

A caspofungina, anteriormente conhecida como MK-0991 e L-743,872, é um fármaco semi-sintético derivado de pneumocandina B₀, isolada do fungo *Glarea lozoyensis* (MASCHMEYER; GLASMACHER, 2005). Tem ação fungicida sobre diferentes espécies de *Candida*, incluindo as amostras resistentes ao fluconazol e anfotericina B. *C. guilliermondii* é menos sensível e algumas amostras desta espécie sofrem ação apenas fungistática (ESPINEL-INGROFF, 1998).

Segundo Arathoon et al. (2002), caspofungina pode eventualmente provocar reações durante a infusão, pois sua estrutura polipeptídica possibilita o surgimento de sintomas decorrentes da liberação de histamina. Outros efeitos adversos foram observados, como febre, cefaléia, náuseas, vômitos, eosinofilia, elevação de enzimas hepáticas e tromboflebite. No tratamento da candidíase orofaríngea ou esofágica, a caspofungina mostrou eficácia comparável à da anfotericina B convencional (ARATHOON et al., 2002) e do fluconazol (VILLANUEVA et al., 2002). O sucesso terapêutico também foi comparável entre a anfotericina B convencional e a equinocandina em casos de candidemia e peritonite por diversas espécies de *Candida* (MORA-DUARTE et al., 2003).

Anidulafungina é um agente antifúngico que, apresenta notável atividade antifúngica contra amplo espectro de espécies de *Candida*, incluindo cepas resistentes a anfotericina B e triazólicos (CANTÓN, 2001).

Estudos clínicos não demonstram diferenças significativas de ação antifúngica entre anidulafungina e fluconazol, em especial no tratamento de infecções invasivas e não invasivas por *Candida*, incluindo candidemias. É bem tolerada, e interações farmacológicas e efeitos adversos sérios não têm sido relatados, podendo ser usada em combinação com outros agentes antifúngicos e co-administrada com drogas imunossupressoras. Seus maiores efeitos adversos são náusea, vômito, diarreia moderada, elevação transitória de enzimas hepáticas e dor de cabeça (MENICHETTI, 2009).

A atividade antifúngica da anidulafungina, eficácia clínica, segurança e características farmacocinéticas transformam-na em um apropriado composto antifúngico alternativo para terapia de infecções fúngicas invasivas e não-invasivas causadas por leveduras ou fungos filamentosos (MENICHETTI, 2009).

A terceira equinocandina foi micafungina introduzida no tratamento das infecções fúngicas invasivas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, recém-nascidos com baixo peso e pacientes com neoplásias. O mecanismo de ação é comparado ao da anfotericina B lipossomal e demais equinocandinas, o qual apresenta bom espectro de atividade contra diferentes espécies de

Candida, demonstrando baixa toxicidade e alta taxa de eliminação (DUPONT, 2010; INFANTE-LÓPEZ & ROJO-CORNEJO, 2009; QUINDÓS et al., 2009;).

3.5 SUSCEPTIBILIDADE À DROGAS ANTIFÚNGICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE LEVEDUROSES INVANSIVA

O estudo da susceptibilidade a antifúngico pode ser usado na descoberta de novas drogas, em estudos epidemiológicos, na definição de novas terapias para o combate das infecções causadas por microrganismos patogênicos, sobretudo as de etiologia fúngica. Alguns fungos não possuem resposta adequada às terapias consideradas padrões e podem requerer o uso de novos compostos com atividade antifúngica, uma vez que a continuidade do tratamento com as drogas clássicas induz o desenvolvimento de resistência e elevado grau de toxicidade (PFALLER et al., 2010; WALSH et al., 2004; REX et al., 2001).

Apesar de serem consideradas menos invasivas e virulentas que as cepas de *C. albicans*, algumas espécies *Candida* não-*Candida albicans* tem menor sensibilidade aos antifúngicos comumente usados (KRCMERY; BARNES, 2002), visto que tem sido descrito um aumento na incidência de espécies *Candida* não-*Candida albicans* na etiologia da candidemia (BONFIETTI et al., 2012; COLOMBO; GUIMARAES, 2003).

Acredita-se que o maior índice de isolamento de *C. glabrata* nos EUA e de *C. parapsilosis* no Brasil e em outros países se deve ao uso do fluconazol de forma empírica e em terapias profiláticas (GALBAN; MARISCAL, 2006). O extenso tempo de utilização destes agentes promove uma pressão seletiva sobre as populações de leveduras (LIN et al., 2005). Pfaller et al. (1999) identificaram que 2,9% dos isolados europeus eram resistentes ao fluconazol, seguido de 2,5% das cepas dos EUA, 2,4% na América Latina e 1,6% no Canadá.

A maior parte dos relatos de resistência das leveduras é atribuída ao fluconazol e equinocandinas com cepas isoladas de pacientes com imunodeficiência humana (HIV) ou que anteriormente foram tratados com essas classes de antifúngicos (ARENDRUP et al., 2014; PFALLER et al., 2010; GALBAN; MARISCAL, 2006). O fluconazol é eficaz contra as variadas espécies de leveduras, contudo, *Candida krusei* possui resistência intrínseca ao fluconazol, ao passo que *Candida glabrata* pode apresentar-se com sensibilidade reduzida a tal fármaco. (PAPPAS et al., 2009).

A resistência aos azólicos também pode ser resultado da exposição prévia a estes compostos devido à presença no meio ambiente, através, resíduos agrícolas (SNELDERS et al., 2009). O uso massivo de azóis na agricultura podem resultar em cepas resistentes inclusive da microbiota fúngica, esta perturbação da microbiota pode ocasionar em mutações genéticas dessa população, resultando em patógenos potencialmente resistentes. De acordo Snelders et al. (2009), essa resistência não é

restrita ao paciente com exposição hospitalar prévia deste fármaco, sendo o meio ambiente um importante determinante na geração de resistências secundária de cepas e hospedeiros. (CHOWDHARY et al., 2014).

A identificação das espécies de leveduras envolvidas nas infecções invasivas e o conhecimento do uso prévio de antifúngicos são de fundamental importância, pois pode sugerir a provável resistência *in vitro* ao fluconazol e a outros fármacos. A anfotericina B constitui-se num recurso extremo para o tratamento de infecções fúngicas, sendo a resistência a esse fármaco ainda pouco frequente. Contudo, existem relatos de isolados de *Candida* não-*Candida albicans*, principalmente *C. krusei*, em que tal fenômeno é identificado, além de isolados de *Trichosporon*, já *Candida auris* tem sido a espécie mais preocupante atualmente, sobretudo no Brasil, que prioritariamente utiliza em seus guidelines fluconazol e anfotericina B, e essa espécie tem se demonstrado totalmente resistente aos referidos fármacos (ARENDRUP et al., 2014; PAPPAS et al., 2009).

A susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos pode não prever o sucesso da terapia, mas a possibilidade de uma droga ou sua concentração falharem é observado quando uma cepa é resistente. Existem vários fatores que além da susceptibilidade *in vitro* influenciam no tratamento: a farmacocinética e farmacodinâmica do medicamento em questão, o grau de debilidade do paciente, o potencial de virulência do patógeno e a acessibilidade do fármaco ao local de infecção. Uma boa resposta imunológica do paciente é de grande valia, visto que os azólicos não são fungicidas, mas fungistáticos (TAPIA et al., 2003).

3.6 CUMARINAS

O gênero *Citrus* (Rutaceae) é originário principalmente em Taiwan, o sul da China, Índia, Vietnã e Malásia. Várias espécies de *Citrus* têm sido utilizadas como alimento, e sua casca, folhas e raízes também têm sido utilizadas na medicina popular ou como especiarias em Taiwan. Entretanto tem sido relatado que espécies de *Citrus* contêm vários compostos com propriedades medicinais como: flavonóides, tetranortriterpenóides, monoterpénóides e várias cumarinas bioativas. Assim como nos *Citrus* as cumarinas são os compostos majoritários presentes nas espécies de *Pterocaulon*, sendo que a maioria apresenta em sua estrutura química o grupamento 6,7-metilenodioxí (WU E FURUKAWA 2018).

Cumarinas são compostos fenólicos de origem natural resultantes do metabolismo secundário, amplamente distribuídas nos vegetais (predominantemente nas Angiospermas), mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. Apresentam uma extensa variedade de efeitos biológicos incluindo anticoagulante, estrogênico, fotossensibilizante, anti-helmíntico, vasodilatador,

moluscicida, sedativo, hipnótico, analgésico, hipotérmico (HOULT e PAYÁ, 1996; OJALA et al., 2000), antioxidante (RAJ et al., 1998; MORABITO et al., 2010) e antitumoral (DEXEUS et al., 1990; NOGUCHI et al., 1995; JIMENEZ-OROZCO et al., 1999; CHIMICHI et al., 2002; YANG, 2010). Atividades antiviral (ZEMBOWER et al., 1997; PATIL et al., 2010), antibacteriana (MAXWELL, 1993; CHIMENTI et al., 2010) e antifúngica (STEIN et al., 2006; THATI et al., 2007; SINGH et al., 2010) têm sido amplamente investigadas. Exemplos de cumarinas com atividade antimicrobiana são herniarina, escopoletina, 7-amino-4-metil-cumarina.

Estudos realizados com a planta *Conium maculatum* têm mostrado que furanocumarinas são os compostos antifúngicos predominantes, além da umbeliferona (FATMA et al., 2004). A atividade antifúngica da escopoletina, proveniente de *Ulmus pumila* e *Ulmus campestris*, também foi verificada (VALLE et al., 1997). Flavonoides e cumarinas têm sido isolados das partes aéreas de *Tordylium apulum*, dentre elas pode se destacar as diidrofuranocumarinas com atividade antifúngica (KOFINAS et al., 1998).

Segundo os estudos de Sardari et al (1999) diversas cumarinas estruturalmente simples, furanocumarinas e cumarinas de origem sintéticas foram testadas quanto à atividade antifúngica frente a leveduras. Angelicina uma furanocumarina isolada de *Diplotaenia damavandica*, bem como seus derivados, apresentaram satisfatória atividade antifúngica, e o grupamento OH livre no C-6 é essencial para a atividade frente ao fungo testado e que o grupamento benzil no C-5 diminui a atividade.

Outro estudo avaliou a atividade antifúngica de cumarinas comerciais, obtidas por síntese e isoladas da planta mexicana *Tagetes lucida* contra fungos filamentosos. A triagem dessas cumarinas indicou que a presença de grupamento metóxi na posição C-7 é fundamental para a atividade e que os grupamentos dimetóxi nas posições C-6 e C-7 favorecem essa atividade (CÉSPEDES et al., 2006). Por sua vez, substituições em C-3 reduzem a atividade antifúngica assim como a introdução de cadeias longas em C-7 (AHMED et al., 2005; TELES et al., 2006; IRANSHAHI et al., 2008).

As cumarinas também foram avaliadas no tratamento de diversas condições clínicas resultando no emprego de variados regimes de dose. As doses recomendadas variam de 8 mg/dia para tratamento de constrição venosa até 7.000 mg/dia para terapia antineoplásica (MARSHALL et al., 1994). Elas são rapidamente absorvidas sofrendo metabolismo hepático CYP2A6 a 7-hidroxycumarina, sendo excretada na urina, na forma de conjugados glicurônicos e sulfatados. Sendo a principal via de metabolismo das cumarinas em primatas é por hidroxilação (PEARCE et al., 1992).

Alterações funcionais no fígado têm sido relatadas em uma pequena proporção de pacientes que tende a reverter à normalidade quando o tratamento é suspenso. A hepatotoxicidade foi observada em ratos e em camundongos, mas não em humanos e esse fato está provavelmente associado à predominância da via de detoxificação através da 7-hidroxilação. Em ratos e camundongos as

principais alterações observadas foram nos rins e pulmões. Os dados disponíveis sugerem que as cumarinas não são agentes genotóxicos, nenhuma evidência de cumarina indutora de genotoxicidade foi observada em estudo *in vivo* em ratos e *Drosophila melanogaster* (LAKE et al., 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este foi um estudo epidemiológico do tipo exploratório e prospectivo que inclui casos de candidíase sistêmicas em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva atendidos no período de agosto de 2017 a abril de 2019. O estudo foi realizado obedecendo às diretrizes e normas regulamentares de pesquisa envolvendo seres humanos de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Ministério da Saúde sendo sua realização foi iniciada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE. Os riscos ao paciente, quando houveram, foram mínimos uma vez que foram minimizados pela realização da coleta das amostras por profissionais habilitados. O material biológico obtido foi utilizado na rotina para diagnóstico e tratamento dos pacientes. Em relação aos riscos referentes aos documentos que poderiam ser utilizados na pesquisa, poderia ocorrer quebra de sigilo ou extravio do material. O único risco direto foi, seria, constrangimento no momento da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), para minimizar este risco a abordagem inicial foi realizada pela equipe de psicologia da unidade de terapia intensiva. No entanto, foi esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma. Os pacientes participantes da pesquisa tiveram como benefícios diretos a rapidez e precisão no diagnóstico micológico, nos quais, levam a uma melhor decisão clínica para um tratamento mais eficaz, melhorando, assim, a qualidade de vida dos pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva, também foram fornecidos subsídios (informações) para maiores esclarecimentos sobre a doença. Os preceitos éticos preconizados na resolução 466/2012 da CONEP foram respeitados e as informações pertinentes às condutas éticas da pesquisa, constarão no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Além de garantir a privacidade do sujeito envolvido na pesquisa. Quando necessário foi utilizado os portuários dos pacientes os mesmos foram solicitados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística – SAME, para complementação da pesquisa.

4.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Foram incluídos nesta pesquisa os participantes que estiverem internados em UTI e que possuíam solicitação médica para diagnóstico micológico. Além disso, foram incluídos no projeto apenas os pacientes que concordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou que, nos casos em que o participante esteja inapto ou incapaz, o seu responsável legal assine. Foram acompanhados os pacientes atendidos no Hospital das Clínicas HC-UFPE e Hospital Getúlio Vargas (HGV-PE).

4.3 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Pacientes externos a Unidade de Terapia Intensiva, pacientes que apresentaram quadro infeccioso compatível com infecção bacteriana ou viral e aqueles que não aceitarem participar da pesquisa mediante a recusa do TCLE.

4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS E DOS DISPOSITIVOS MÉDICO INVASIVOS

As coletas foram realizadas em pacientes (n=100) internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) do Hospital das Clínicas de Pernambuco e Hospital Getúlio Vargas da cidade do Recife-PE. As amostras foram coletadas e processadas a depender do material biológico. Amostras de sangue, foram coletadas em dias consecutivos, assepticamente por punção venosa em tubos Vacutainer® com EDTA e posteriormente, acondicionadas em tubos contendo meio *Brain Heart Infusion-BHI*. Para as amostras obtidas por biopsia, fluídos biológicos como líquido céfalo raquidiano, lavado brônquico alveolar, secreção de feridas, entre outros, estas foram acondicionadas assepticamente e encaminhadas para o Laboratório de Micologia do Centro de Biociências para realização do diagnóstico laboratorial micológico através de exame direto e cultura. Paralelamente, as amostras dos dispositivos médicos invasivos como cateter, sondas entre outros, em uso pelos pacientes, foram obtidas para isolamento de leveduras que possivelmente estiverem colonizando o material.

4.4.1 Realização do diagnóstico micológico e isolamento fúngico a partir dos dispositivos médicos invasivos

Após a obtenção das amostras clínicas (pacientes e dispositivos), foram preparadas lâminas sem adição de corante ou clarificante e, quando necessário, foram clarificadas com solução aquosa a 20% de Hidróxido de Potássio-KOH, contrastadas com Nankin e/ou coradas com Giemsa. Concomitantemente, as amostras foram semeadas em duplicata na superfície de meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias estas foram purificadas e identificadas.

4.4.2 Purificação dos isolados

Para purificação dos agentes etiológicos, foram colocados fragmentos da colônia em água destilada esterilizada suplementada de 50 mg/L cloranfenicol. Desta suspensão 0,2 mL foram semeados por estria na superfície do meio SDA com antibiótico contido em placas de Petri. Posteriormente, as unidades formadoras de colônias serão repicadas para tubos de ensaio contendo mesmo meio, para posterior identificação.

4.5 Identificação dos isolados clínicos e obtidos dos instrumentos médico-invasivos

A identificação foi realizada através de kits comerciais CHROMagarTM (COL et al., 2009, Mímica et al., 2009), além da observação características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas das culturas (identificação morfofisiológica) segundo Barnett et al. (2000), as espécies tiveram ainda sua taxonomia confirmada através da espectrometria de massa MALDI TOF (PUTIGNANI et al., 2010; VEEN et al., 2010).

4.5.1 Identificação pelo CHROMagar *Candida* (COL et al., 2009, MÍMICA et al., 2009)

A partir das amostras de leveduras foram preparadas suspensões em água destilada esterelizada. Em seguida, será ajustada a turbidez para concentração correspondente ao padrão 2 da escala de McFarland. Posteriormente, as referidas suspensões foram semeadas no meio CHROMagar *Candida* contido em placas e incubadas a 37 °C durante 48 horas. A leitura seguiu as cores relacionadas às espécies a exemplo de *C. albicans* (cor verde), *C. tropicalis* (azul) e *C. krusei* (rosa).

4.5.2 Identificação automatizada pelo Vitek 2 Compact

Para análise automatizada, foram preparadas suspensões através da transferência de colônias das leveduras para 3,0 ml de solução salina (solução aquosa a 0,45% a 0,50% de NaCl, pH 4,5 a 7,0) estéril (Sigma). A turvação foi ajustada de acordo com a escala (1,80 - 2,20) de McFarland. As suspensões das leveduras foram colocadas no cassete junto com os respectivos cartões de identificação e postas no aparelho de vácuo integrado. Em seguida, o cassete contendo as suspensões foi colocado manualmente no equipamento (Vitek2[®] Compact, bioMérieux) na câmara de vácuo. Os resultados obtidos foram transportados para um sistema óptico de reação de leitura, o qual é conjugado ao computador onde os dados foram transferidos e processados. Os cartões inoculados, vedados e incubados foram mantidos a 35,5 °C + 1,0 °C (MONDELLI *et al.*, 2012).

4.5.3 Identificação morfofisiológica

Morfologia das células vegetativas crescidas em meio líquido e sólido

A forma das células vegetativas como critério taxonômico foram verificadas através de lâminas contendo fragmentos da cultura (crescimento em meio ágar Sabouraud dextrose) corados com azul de Aman (lactofenol *blue*) e observadas quanto as diferentes morfologias. O comprimento e a largura das células foram medidos e os valores obtidos da medição de pelo menos 20 células foram determinados (LODDER, 1970).

Formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidósporo

A verificação da formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidósporos foram realizadas em ágar-fubá (CornMeal agar, fazendo-se duas estrias paralelas, as quais foram recobertas com lamínula esterilizada. Para evitar a dessecação do meio, o procedimento foi realizado em câmara úmida e a visualização das estruturas através foi feita após 24h, 48h e 72h (LODDER, 1970).

Hidrólise da Uréia

As amostras com até 48h de crescimento foram semeadas em ágar uréia e incubadas a 37°C. Os tubos foram examinados a cada meia hora por até quatro horas a fim de verificar a mudança de cor (amarelo para vermelho), indicando produção de urease (BARNETT; PAINE; YARROW, 2000).

4.5.4 Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF

Os isolados foram submetidos à análise direta por espectrometria de massa (MALDI-TOF; MALDI Autoflex, BrukerDaltonics, Bremen, Germany). O cultivo e manutenção dos isolados foram em meio de cultura Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Para padronização células da bactéria *Escherichia coli*, foram utilizadas como calibrante, cultivadas e mantidas em meio ágar Luria-Bertani (LB), ainda, foi cultivado em YEPD e incorporado nas análises *Trichophyton rubrum* controle externo. Durante o procedimento as incubações foram padronizadas em 20h e as linhagens se desenvolverão aerobicamente a 37°C. Todas as culturas foram analisadas antes do uso quanto à pureza e foram novamente repicadas pelo menos uma vez antes da análise pelo MALDI TOF MS.

A partir do cultivo celular, foi realizado o procedimento de extração proteica. Onde foi adicionado 300 µL de água em cada microtubo (1,5mL) e transferido uma alíquota dos microrganismos para o tubo, seguida de agitação por vórtex. Foi adicionado 900 µL de Etanol e agitado por vórtex completamente, em seguida as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos. Todo o excesso de etanol foi removido e foi adicionado 50µL de ácido fórmico a 70% e homogeneizado, logo em seguida foi adicionado 50 µL de acetonitrila a 100% e foi agitado vórtex completamente. A amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 5min e partir daí, 1 µL do sobrenadante foi colocado sobre os 48 anéis da placa de aço; após secagem rápida, foi adicionado 1 µL de matriz-composto orgânico capaz de absorver radiação na região do espectro onde o laser opera (75mg/mL de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico-CHCA em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético-TFA) e deixado secar a temperatura ambiente.

As amostras foram cristalizadas em temperatura ambiente (20 ± 2 °C) e transferidas em duplicata para testar a reprodutibilidade do isolado. Durante as análises todas as soluções foram preparadas e estocadas a +5 °C (Putignani et al., 2010; Veen et al., 2010). Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através de um laser de nitrogênio (337

nm), onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. *E. coli* DH5 α com conhecidos valores de massa das proteínas ribossomais foi usada para calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais foram alcançadas. Identificação através do software Biotyper™ foi baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

4.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS

Os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* foram realizados seguindo o protocolo descrito no documento M27-A3, M60 e M59b (CLSI, 2008/2017/2020). O isolado de *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizados como controle. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0 \pm 0,1, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol. L⁻¹; Sigma-Aldrich). Os agentes antifúngicos utilizados foram o fluconazol (Pfizer) preparado em água deionizada, a anfotericina B (Bristol-Myers Squibb), a Caspofungina (Merck Sharp & Dohme), micafungina (Astellas Pharma Tech CO) e anidulafungina (Pfizer), e escoparone 6-7dimethoxicumarina (SIGMA/MERCK) todos diluídos em Dimetil-sulfóxido.

As leveduras clínicas e isoladas dos instrumentos foram mantidas em meio SDA e incubadas a 35°C. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e a densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de 2-5x10³ céls/mL. Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas, e as placas foram incubadas a 35°C durante 24.

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram determinadas com inibição de 100% para anfotericina B e escoparone 6-7dimethoxicumarina e \geq 50% em relação ao poço controle para o fluconazol, a capofungina, a micafungina e a anidulafungina.

4.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO

As leveduras foram cultivadas em *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD) a 37°C overnight, em seguida foram suspensas em meio RPMI tamponado com HEPES e ajustada para concentração de 10⁶ células/ml. Posteriormente 100 µL serão adicionadas em poços das placas de poliestireno contendo 96 poços, sendo mantidas a 37°C por 24 horas. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS) para remover células não aderentes. E então foram incubadas durante 48h à 37°C para posterior avaliação.

A quantificação dos biofilmes foi realizada com o ensaio de redução de sal de tetrazólio, onde 20 µL, na proporção de 5 µL para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (*Millipore*, poros de 0,22µm) foi adicionado à cada poço da placa de microtitulação, inclusive nos controles. As placas foram incubadas na ausência de luz à temperatura de 37°C, por 18 horas. Posteriormente, o corante foi aspirado e então adicionado 200 µL de isopropanol (FREMOSIER et al., 1999; BERRIDGE; HERST; KROM et al., 2007). As placas foram mantidas em repouso por 15 minutos e em seguida foram transferidos 100 µL do conteúdo de cada poço para nova placa de microtitulação afim de proceder à leitura em leitor de microplacas com 540 nm de comprimento de onda (RAMAGE et al., 2002; KROM et al., 2007; PIERCE et al., 2008).

4.8 TRATAMENTO DE BIOFILME FÚNGICO

Foram selecionados os melhores produtores de biofilme de cada espécie e a partir da formação deste nos poços das placas de poliestireno com período de incubação de 48 horas, como descrito anteriormente no item 5.6. Em cada placa foi preparado um controle negativo (poço sem formação de biofilme, poço nº1 com RPMI), um controle de 100% de crescimento (com suspensão de células em RPMI). Depois de formado, o biofilme foi lavado com 100µL de PBS estéril por três vezes para remoção das células não aderentes. A seguir, nos poços 2 a 11 foi colocada solução de 100µL de solução de antifúngico em diluição seriada e no poço 12, novamente RPMI, incubando-se a 37°C durante 48 horas.

Decorrido o tempo de incubação, a droga foi aspirada e cada poço lavado três vezes com PBS estéril. Na sequência, será colocado em todos os poços 20 µL do corante de viabilidade celular (MTT-*Sigma Chemical, St. Louis, MO*). Após incubação de 18h no escuro, o corante foi removido, o poço lavado e adicionado isopropanol (200 µL). Posteriormente, foram retirados 100 µL de cada poço, transferindo-se para nova placa. A absorbância do conteúdo dos poços da placa foi lida a 540nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço 12, que corresponde a 100% de crescimento, livre de droga (HAWSER; DOUGLAS, 1994; DE LOGU et al., 2005).

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados referentes a produção e tratamento de biofilme foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey, com o nível de significância de $P < 0,05$. Através do software Graphpad prism 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DIAGNÓSTICO DE LEVEDUROSES SISTÊMICAS E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Durante o período de Julho de 2017 a Março de 2019, foram coletadas 391 amostras provenientes de 260 pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva dos Hospitais das Clínicas e Getúlio Vargas ambos hospitais situados no município do Recife/PE (Fig 1). O diagnóstico micológico foi baseado na presença de estruturas em parasitismo nas amostras clínicas, sendo observadas células de leveduras ovais, hialinas e/ou encapsuladas, brotantes e artrosporadas ao exame direto e no isolamento em cultura (Fig 2).

Foram obtidas 87 cepas de leveduras o que implica numa incidência de leveduroses de 22% aproximadamente, sendo 14 cepas oriundas do Hospital das Clinicas e 73 do Hospital Getúlio Vargas estas pertencente a 73 pacientes, onde 41 eram do gênero masculino, com idade variando dos 18 aos 88 anos, com mortalidade atribuível de 67% (n=49) (Tabela 2; Fig 3). Nenhum dos pacientes avaliados tinha sido transferido de outro setor de internação nas 48 horas anteriores ao episódio de levedurose. As principais doenças de base apresentadas pelos pacientes foram de origem cardiovascular, diabetes mellitus, neoplasias, hepatite, doença de Crohn e pancreatite. As condições de risco mais prevalentes foram uso de cateter venoso central, internação superior a 15 dias, uso de nutrição parenteral, procedimento cirúrgico, uso de antibióticos de amplo espectro e uso de medicações imunossupressoras como corticosteroides. A maioria dos pacientes apresentaram quadros de neutropenia, diante dos resultados do leucograma.

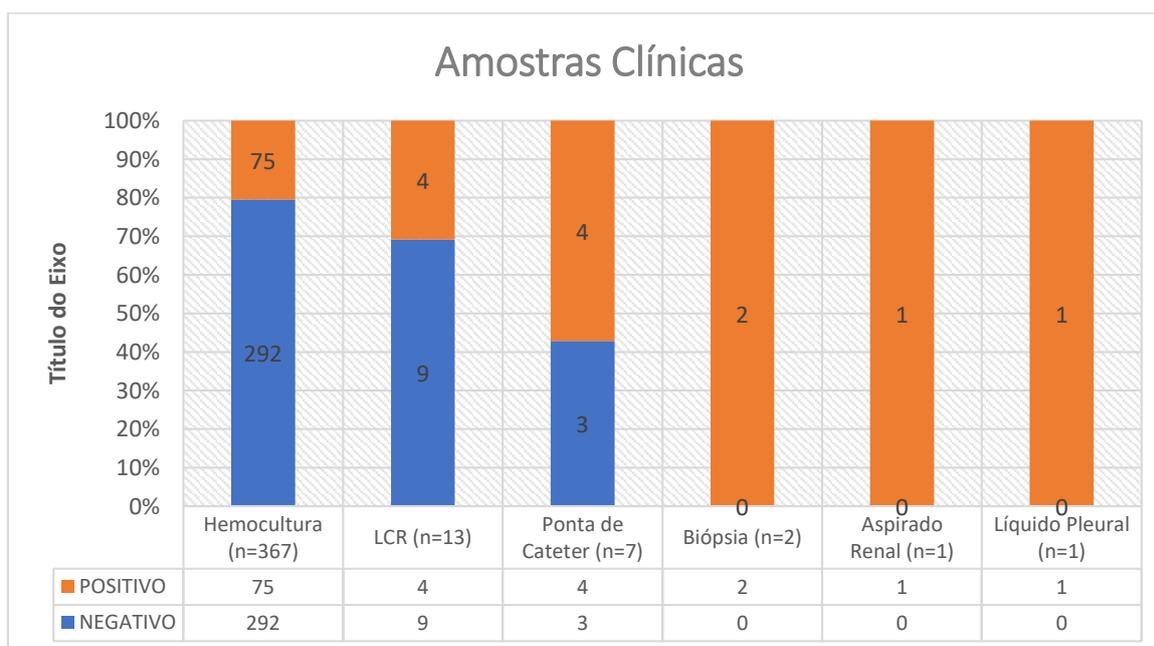


Figura 1 – Amostra Clínicas de pacientes internos em Unidades de Terapia Intensiva de Hospitais terciários do Recife

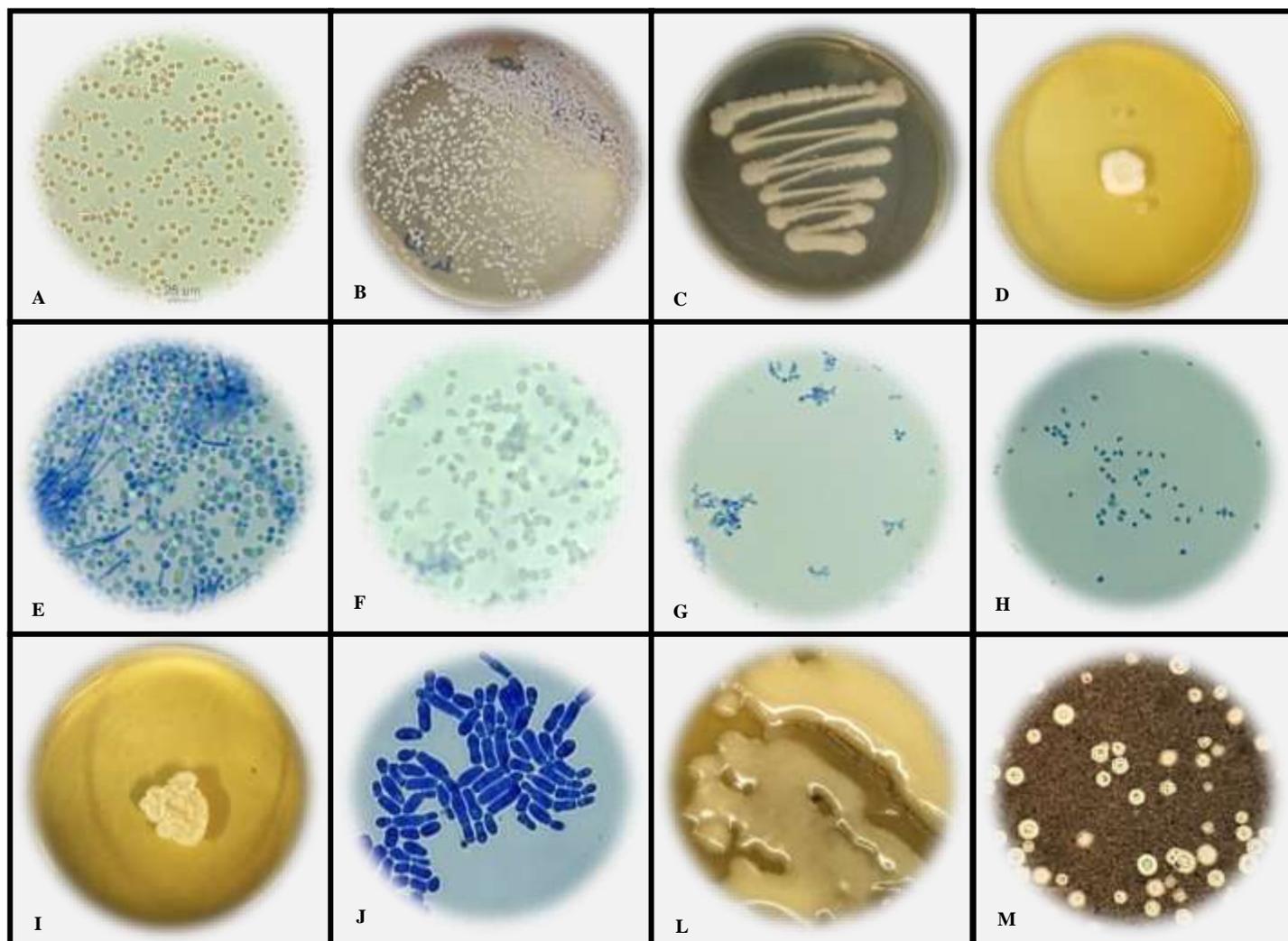


Figura 2 – A- Presença de células de leveduras em amostra de sangue; B – Isolamento primário de hemocultura em meio DAS; C- Purificação do isolamento primário; D- Colônia central de *Candida* spp; E – Micrografia de *Candida albicans* com presença de micélio verdadeiro e leveduras; F - Micrografia de *C. tropicalis* com presença de leveduras globosas; G- Micrografia de *C. parapsilosis* com presença de leveduras e pseudohifas; H- Micrografia de *C. glabrata* com presença de leveduras ovais; I- Macroscopia de *Trichosporon* sp; J- Micrografia de *Trichosporon* sp com presença de leveduras artrosporadas; L- Macroscopia de *Cryptococcus* sp; M- Micrografia de *Cryptococcus* sp com presença de leveduras encapsulada.

TABELA 2. Perfil epidemiológico dos 73 pacientes com episódios de leveduroses sistêmicas em Unidade de Terapia Intensiva de Hospitais terciários do Recife.

VARIÁVEIS	NÚMEROS
Valores de pacientes	73
Idade anos (média)	58,73
Gênero (%)	M = 41
Permanência em UTI	≈ 29,2 dias
Mortalidade	n=49 (67%)

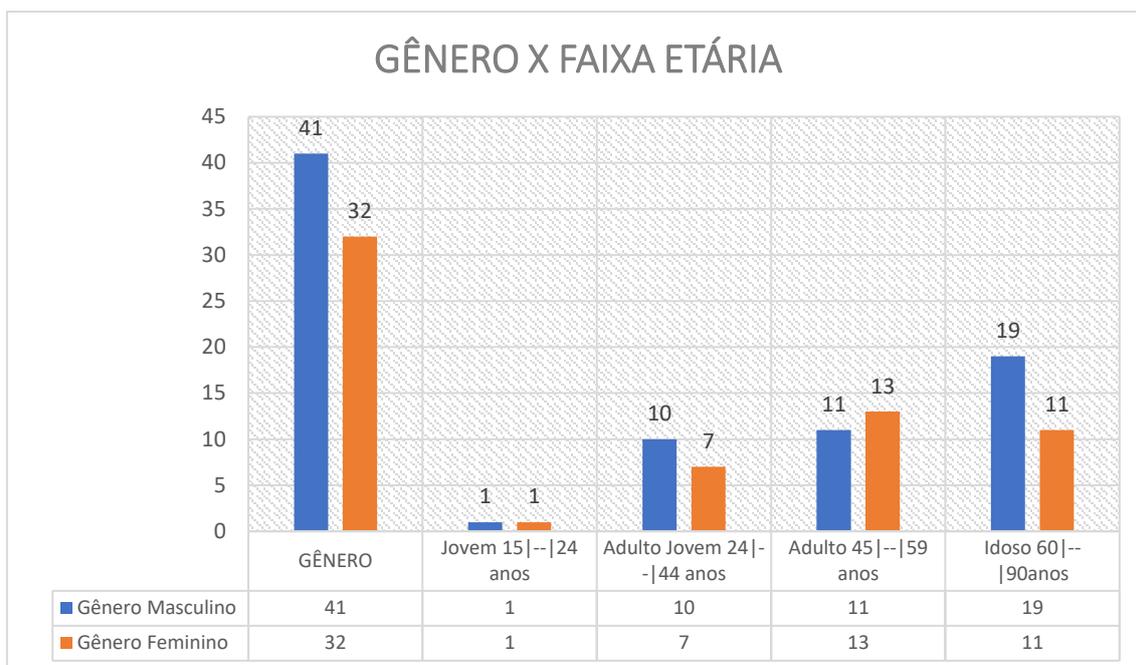


Figura 3 – Distribuição do gênero e faixa etária de paciente internos em Unidades de Terapia Intensiva de Hospitais terciários do Recife

As IRAS em UTIs estão em sua maioria associadas à gravidade clínica dos pacientes e à realização de procedimentos invasivos, como o uso de cateter venoso central, sonda vesical de demora, ventilação mecânica, dentre outros. Além do uso de imunossupressores, e prescrição recorrente de antimicrobianos como medida profilática, o que proporciona a seleção de microrganismos resistentes, impondo assim um grande desafio para o controle dessas infecções (OLIVEIRA et al, 2014).

O grupo de pacientes com leveduroses diagnosticados durante esta pesquisa apresentavam tais condições de risco prevalentes bem como foram expostos a diversos fatores predisponentes. Em sua maioria, os estudos relatam que a corrente sanguínea é o sítio de infecção mais comum quando associado a dispositivos implantados como os cateteres venosos centrais que se configuram como a principal causa de infecção primária da corrente sanguínea em pacientes internados em UTIs (REIS et al, 2011). Dados que corroboram os nossos estudos onde 86% das infecções eram provenientes da corrente sanguínea com associação à dispositivos médicos invasivos.

O gênero masculino, foi o mais acometido, com faixa etária variando de 18 a 88 anos. Estes dados corroboram a Bassetti et al. (2015), em um estudo epidemiológico nas UTIs de 13 hospitais europeu, onde os pacientes com leveduroses confirmada tinham idade superior a 63 anos e 57% eram do gênero masculino. Anteriormente Bassetti et al. (2013), realizou esse mesmo estudo em hospitais públicos da Itália e Espanha, observando que a média dos pacientes internados, superior aos 60 anos; e 57% destes correspondiam ao gênero masculino. Tais dados reforçam nossos achados quanto ao perfil obtido em nossos estudos. Entretanto para Rodriguez et al. (2017), o gênero envolvido em episódios

de infecção fúngica sistêmica não possui uma relação direta quanto a frequência do grupo acometido, uma vez que fatores como idade avançada, doenças de bases e até mesmo tempo de internação prolongado, podem ser fatores essenciais para desencadeamento dessa infecção.

Para Cunha et al., (2005) a mortalidade geral dos pacientes com fungemia disseminadas, é de aproximadamente 60%, já Papas et al., (2018), destaca que candidemia associada a uma mortalidade superior a 70%, tais estudo reforçam nossos dados onde observamos um a taxa de mortalidade por leveduroses em pacientes de UTIs de 67%, e quando relacionado apenas candidemia essa taxa superou os 70%.

O diagnóstico das leveduroses ainda é um grande desafio para equipe médica tendo em vista os sinais e sintomas inespecíficos dessas infecções, bem como a baixa sensibilidade e especificidade do “padrão-ouro” para os casos de fungemia, uma vez que as hemoculturas, apresentam uma sensibilidade de apenas 50% e seus resultados têm atrasos de pelo menos 72 horas após a suspeita, o que geram elevados diagnósticos falso-negativo contribuindo para os altos índices de mortalidade. Para Brandão-Neto, 2014, o uso de ferramenta como imunofluorescência e técnicas de PCR (*Polymerase chain reaction*) são outra alternativa importante para auxiliar esses diagnósticos. Somado a isto, acreditamos que a busca por testes rápidos de diagnósticos e o uso de inteligência artificial são essenciais para minimizar os impactos ocasionados por estas infecções.

5.1.1 Abordagem polifásica para caracterização taxonômica dos isolados clínicos de leveduras

Todos os isolados foram identificados através do semeio em CHROMagar *Candida* (Fig. 4), sendo também realizada a assimilação de fontes de carbono por meio de automação através do VITEK® e BD Phoenix, e posteriormente realizadas análises proteômicas por espectrometria de massas através do MALDI-TOF. (Tabela 3)

Foram identificados 87 agentes etiológicos sendo observada uma prevalência de *Candida tropicalis* (24/87) seguida de *C. albicans* (23/87), *C. parapsilosis* (18/87), *C. glabrata* (13/87), *Cryptococcus neoformans* (4), *Kodamaea ohmeri* (02/87), *C. metapsilosis* (1/87), *C. haemulonii* (1/87) e *Trichosporon inkin* (1/87). (Fig. 5 e Fig 6)

Tabela 3. Identificação polifásica de isolados de leveduras oriundas de Unidades de Terapia Intensiva de Hospitais terciários do Recife

Nº	Cod	IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA		
		CHROMagar	VITEK	MALDI TOF
1.	HC 04	<i>C. albicans</i>	<i>Candida spp</i>	<i>C. albicans</i>
2.	HC 48	<i>C. albicans</i>	<i>Candida spp</i>	<i>C. albicans</i>
3.	HC 49	<i>C. albicans</i>	<i>Candida spp</i>	<i>C. albicans</i>
4.	HGV 02	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>
5.	HGV 03	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
6.	HGV 16	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
7.	HGV 18	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
8.	HGV 19	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
9.	HGV 23.1	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
10.	HGV 23.2	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11.	HGV 25	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
12.	HGV 26	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
13.	HGV 33.2	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans /C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
14.	HGV 36	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
15.	HGV 46	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
16.	HGV 47	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
17.	HGV 49	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
18.	HGV 51	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
19.	HGV 53.1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
20.	HGV 53.2	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
21.	HGV 06	<i>C. krusei</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>C. metapsilosis</i>
22.	HGV 15	<i>C. krusei</i>	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. haemulonii</i>
23.	HC 07	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida spp</i>	<i>C. albicans</i>
24.	HC 08.2	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
25.	HC 08.3	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
26.	HC 11	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida spp</i>	<i>C. albicans</i>
27.	HC 47	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida spp</i>	<i>C. tropicalis</i>
28.	HC 50	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida spp</i>	<i>C. tropicalis</i>
29.	HGV 08	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
30.	HGV 09	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
31.	HGV 11	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
32.	HGV 13	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>
33.	HGV 17.1	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
34.	HGV 17.2	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>

35.	HGV 17.3	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
36.	HGV 21	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
37.	HGV 27	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
38.	HGV 31	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
39.	HGV 34	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
40.	HGV 35	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
41.	HGV 37	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
42.	HGV 39.1	<i>C. tropicalis</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>C. tropicalis</i>
43.	HGV 39.2	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
44.	HGV 40	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
45.	HGV 42	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
46.	HGV 44	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
47.	HGV 45	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
48.	HGV 48	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
49.	HGV 50	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>
50.	HGV 55	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
51.	HGV 01.1	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
52.	HGV 01.2	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
53.	HGV 04	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
54.	HGV 05	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon inkin</i>
55.	HGV 07	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
56.	HGV 10.1	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
57.	HGV 10.2	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
58.	HGV 10.3	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
59.	HGV 12	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
60.	HGV 14	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
61.	HGV 20	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
62.	HGV 22.1	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
63.	HGV 22.2	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
64.	HGV 24.1	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
65.	HGV 24.2	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
66.	HGV 28	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
67.	HGV 29	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
68.	HGV 30	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
69.	HGV 32	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. famata</i> / <i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>
70.	HGV 33.1	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
71.	HGV 38	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
72.	HGV 41	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
73.	HGV 43	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
74.	HGV 52	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>

75.	HGV 54.1	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
76.	HGV 54.2	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
77.	HGV 56	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
78.	HGV 57.1	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
79.	HGV 57.2	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
80.	HGV 58	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
81.	HGV 59	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
82.	HC 01	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
83.	HC 27	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Candida</i> spp	<i>C. parapsilosis</i>
84.	HC 30	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Candida</i> spp	<i>C. parapsilosis</i>
85.	HC 32	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Cryptococcus</i> sp	<i>C. tropicalis</i>
86.	HC 38	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Candida</i> spp	<i>C. parapsilosis</i>
87.	HC 46	<i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	<i>Candida</i> spp	<i>C. glabrata</i>



Figura 4 –Identificação de leveduras obtidas de pacientes com levedurose sistêmica por meio CHROMágar.

A taxonomia de leveduras é extremamente complexa, tendo em vista as metodologias atualmente utilizadas para a classificação de espécies, que utiliza características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (DE HOOG et al., 2000). Em muitos casos, os taxonomistas têm grandes dificuldades para determinar quais são as características que realmente definem uma espécie ou gênero. Em nosso estudo utilizamos uma abordagem polifásica para determinação das espécies de leveduras.

Foi evidenciado neste trabalho que *C. tropicalis* foi a espécie mais incidente (27,6%) no universo de 87 isolados, seguido por *C. albicans* (26,4%). As espécies de *Candida*- não *C.albicans* corresponderam à 71% dos casos. Em estudo realizado na Índia (CHAKRABARTI et al 2015), considerando apenas os isolados de UTI, 80% correspondiam a espécies de *Candida*- não *C.albicans*. A distribuição geral das espécies depende da distribuição geográfica e das características clínicas associadas aos pacientes. A mudança na epidemiologia das infecções por *Candida* em conexão com espécies de *Candida* - não *C.albicans* é clinicamente relevante, sobretudo entre que apresentam resistência intrínseca aos antifúngicos (LAMOTH et al 2018; TAKEUCHI et al 2002).

Nos Estados Unidos da América, um estudo realizado em 56 hospitais entre 1998 e 2006 constatou 1218 episódios de infecções na corrente sanguínea por espécies *Candida*. A espécie *C. albicans* foi a mais prevalente, identificada em 611 casos (50,7%), seguida por *C. parapsilosis* (17,4%), *C. glabrata* (16,7%) e *C. tropicalis* (10,2%). A proporção de espécies de *Candida* - não *C.albicans* aumentou significativamente ($p < 0,001$) (GIL et al 2016).

Nas UTIs de hospitais europeus e australianos, *C. glabrata* é geralmente o isolado de *Candida* não-*C.albicans* mais comum, responsável por cerca de 20% das infecções. Além disso, *C. glabrata* é menos virulenta que *C. albicans* e está associado ao aumento da idade e a transplantes de órgãos sólidos. Os isolados de *C. tropicalis* são semelhantes aos de *C. albicans* em termos de virulência e são comparativamente menos frequentes (aproximadamente 9%) (NOREEN et al 2015).

Na América do Sul, *C. tropicalis* é o isolado *Candida* - não *C.albicans* mais comum (aproximadamente 20%), enquanto *C. glabrata* é isolado em cerca de 9% dos casos. Essas diferenças na distribuição das espécies podem ajudar a explicar as diferentes taxas de mortalidade associadas à candidemia relatadas na Europa (50%) e na América do Sul (70%) (NOREEN et al 2015).

A relação entre as espécies de *C. albicans* e *Candida*- não *C.albicans* encontradas no presente estudo está de acordo com a maioria das publicações, cujas evidências sugerem uma mudança nas últimas décadas em relação às proporções estimadas. Observa-se uma diminuição na proporção de *C. albicans* e um aumento em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, principalmente em estudos nos EUA e na Europa. Os resultados apresentados aqui refletem, no entanto, uma proporção maior de *C. tropicalis* que *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e outras espécies.

Recentemente, *C. auris* tem surgido como importante patógeno emergente em infecções fúngicas hospitalares. No Brasil, já houve notificação de um caso, entretanto, as limitações nos métodos laboratoriais podem encobrir a ocorrência desse agente, pois muitas vezes vem sendo caracterizada equivocadamente como *C. haemulonii*, *C. famata* e/ou *Rhodotorula glutinis* pelos sistemas automatizados (CALVO et al., 2016).

Em 2017 um estudo realizado por Sarma; Upadhyay, evidenciou a enorme dificuldade em relação a identificação automatizada desse fungo. Entretanto, não apenas as espécies emergentes requerem atenção quanto ao diagnóstico (OLIVEIRA et al., 2014).

Em nosso estudo espécies de *C. tropicalis* foram identificadas como *C. glabrata*, *C. albicans* como *C. famata* e *C. parapsilosis* como *C. albicans* pelo método automatizado VITEK2. Assim incorporação de técnicas proteômicas associadas com as técnicas já disponíveis vêm contribuindo significativamente para o diagnóstico com alta confiabilidade, eficácia e precisão, culminando no melhor prognóstico para o paciente (OLIVEIRA et al., 2014).

Estudos demonstraram o desempenho de MALDI TOF MS para a identificação de espécies de *Candida*. Pulcrano et al. (2013), avaliaram 82 leveduras, isoladas de infecções da corrente sanguínea, onde todos isolados foram identificadas a nível de espécie. Na pesquisa realizada por Yaman et al. (2012), foram identificadas 281 leveduras isoladas a partir de culturas de sangue.

Em nosso estudo, MALDI-TOF MS, foi a ferramenta de diagnóstico que favoreceu a melhor confiabilidade e rapidez na identificação dos agentes etiológicos, sendo possível distinguir espécies como as pertencentes ao Complexo *C. parapsilosis* que são fenotipicamente iguais, mas genotipicamente diferentes.

Entretanto quando pensamos nos gêneros *Cryptococcus* e *Trichosporon*, encontramos uma limitação maior no que diz respeito a taxonomia uma vez que as ferramentas moleculares são a forma de identificação de espécies mais confiáveis, seja pelo sequenciamento ou por espectrometria de massa (ARENDRUP et al., 2017). Sendo essa identificação precisa a nível de espécies o que pode predizer o a escolha do tratamento específico bem como sucesso terapêutico.

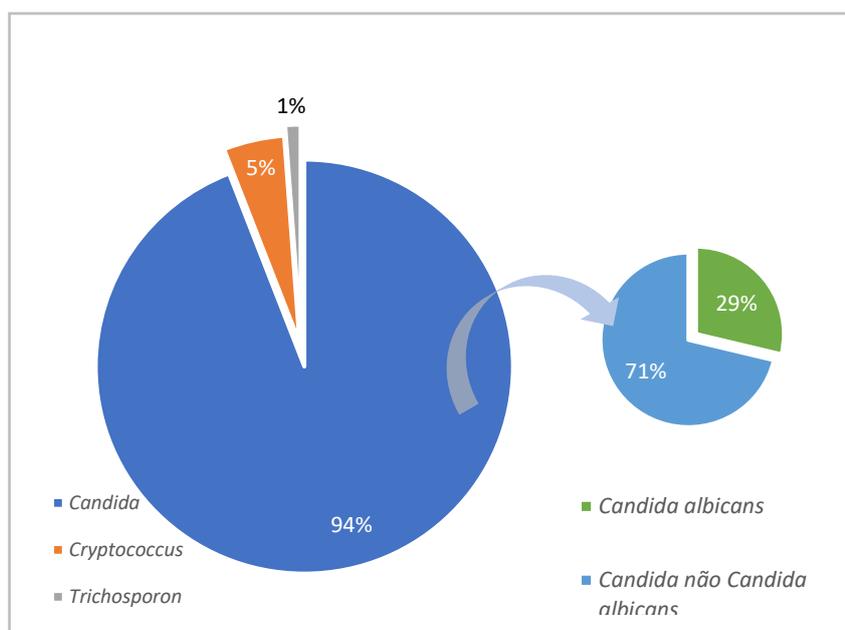
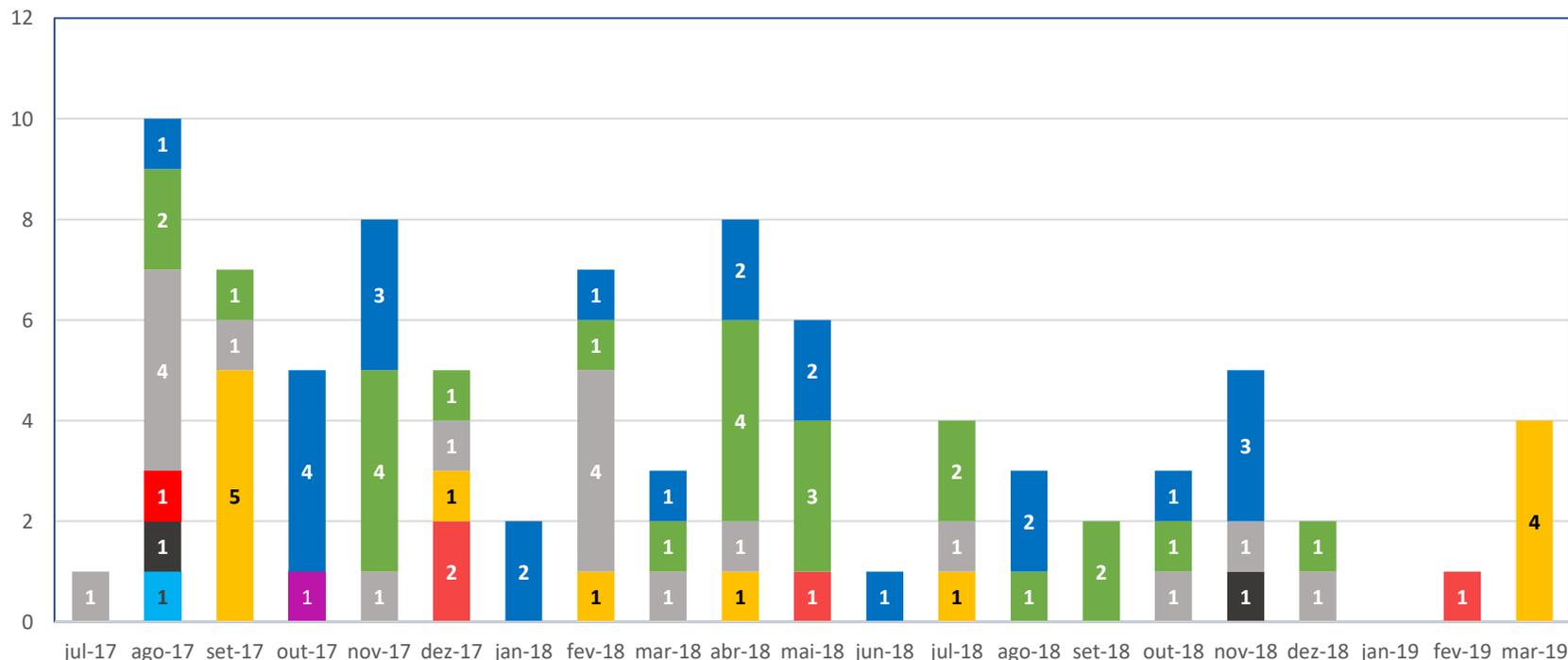


Figura 5 - Incidência das espécies de leveduras clínicas de pacientes com levedurosos sistêmica, internados em Unidades de Terapia Intensiva



	Jul-17	Ago-17	Set-17	Out-17	Nov-17	Dez-17	Jan-18	Fev-18	Mar-18	Abr-18	Mai-18	Jun-18	Jul-18	Ago-18	Set-18	Out-18	Nov-18	Dez-18	Jan-19	Fev-19	Mar-19	
■ <i>C. albicans</i> (n=23)		1		4	3		2	1	1	2	2	1		2		1	3					
■ <i>C. tropicalis</i> (n=24)		2	1		4	1		1	1	4	3		2	1	2	1		1				
■ <i>C. parapsilosis</i> (n=18)	1	4	1		1	1		4	1	1			1			1	1	1				
■ <i>C. glabrata</i> (n=13)			5			1		1		1			1									4
■ <i>C. metapsilosis</i> (n=1)		1																				
■ <i>C. haemulonii</i> (n=1)				1																		
■ <i>Kodamaea ohmeri</i> (n=2)		1															1					
■ <i>Cryptococcus neoformans</i> (n=4)						2					1										1	
■ <i>Trichosporon inki</i> (n=1)		1																				

Figura 6 - Espécies identificadas a partir de 87 amostras clínicas de pacientes com levedurosos sistêmica, internados em Unidades de Terapia Intensiva

5.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos 87 isolados frente a oito antifúngicos padrões com valores de CIM variando de $0,125 \geq 64 \mu\text{g/mL}$ para fluconazol apresentando 46/87 isolados sensíveis, 19/87 dose dependente e 22/87 resistente ($\text{CIM} \geq 8 \mu\text{g/mL}$), Itraconazol apresentou CIM com variação de $0,03 \geq 16 \mu\text{g/mL}$ sendo 61/87 isolados sensíveis 03/87 dose dependentes e 23/87 resistentes ($\text{CIM} \geq 1 \mu\text{g/mL}$); Voriconazol demonstrou CIM variando de $0,03 \geq 16 \mu\text{g/mL}$, sendo 36/87 isolados sensíveis, 22/87 dose dependentes e 29/87 resistentes ($\text{CIM} \geq 1 \mu\text{g/mL}$), Cetoconazol apresentou CIM variando de 0,03 a $4 \mu\text{g/mL}$ sendo portanto todos os isolados considerado sensíveis, Quanto as equinocandidas, micafungina aparentou MIC variando de $0,03 \geq 16 \mu\text{g/mL}$, tendo 71/87 isolados sensíveis, 03/87 dose dependentes e 13 resistentes ($\text{CIM} \geq 0,5 \mu\text{g/mL}$), Anidulafungina apresentou variações de CIM $0,03 \geq 16 \mu\text{g/mL}$, sendo 50/87 cepas sensíveis, 14/87 dose dependentes e 23/87 resistentes ($\text{CIM} \geq 0,5 \mu\text{g/mL}$), Caspofungina apresentou CIM com variação de $0,03 \geq 16 \mu\text{g/mL}$, 58/87 isolado foram sensíveis, 10/87 dose dependentes e 19/87 resistentes ($\text{CIM} \geq 0,5 \mu\text{g/mL}$), Anfotericina B apresentou CIM $0,25 \geq 2 \mu\text{g/mL}$, onde 79/84 cepas foram sensíveis para este fármaco e 8/87 foram resistentes com $\text{CIM} \geq 2 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 4).

O conhecimento da epidemiologia local, antifungigrama e o histórico de exposição antifúngica do paciente são fundamentais para o gerenciamento adequado da terapêutica. O aumento na incidência de espécies de *Candida* não – *C. albicans* tem tornado a terapia mais complicada, uma vez que este aumento pode está sendo influenciado pela profilaxia antifúngica ou mesmo exposição prévia, estudos tem demonstrado que paciente que não foram expostos de forma empírica ao fluconazol tem menos chances de desenvolver resistências ao referido fármaco (ROBBINS e al, 2017). Em nosso estudo podemos observar que aproximadamente 53% das cepas foram sensíveis ao fluconazol, entretanto em sua maioria eram espécies de *C. albicans*, dados que corroboram também os estudos de Berkow et al, 2017, onde demonstram que *C. albicans* tem uma baixa incidência de resistência ao fluconazol, aproximadamente 0,5 a 2%, já *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, por outro lado, tem taxas mais altas em 4-9%, 2–6% e 11–13%, respectivamente. A levedura emergente *C. auris* pode exibir uma taxa de resistência ao fluconazol alta como 93%, isso também reformas os estudos de Robbins et al, 2017, onde destaca que uso extenso do fluconazol como profilático tem resultado no desenvolvimento de resistência generalizada. De acordo com Alexander et al., 2005 os pacientes que são expostos ao fluconazol, possuem potencial de desenvolver resistência cruzada ao voriconazol, dados que reforçam em nossos estudos onde 86% dos isolados resistentes a fluconazol também apresentaram padrões de resistência a voriconazol.

O aumento na resistência dos antifúngicos azólicos pode estar ligado a ocorrência do fenômeno *trailing* pode conferir erros graves na leitura da reação de inibição que ocorre nos testes

de sensibilidade. Um isolado com *trailing* pode demonstrar alta sensibilidade nas primeiras horas de leitura, isto é, 24h e resistência após este período (REVANKAR et al. 1998). Esse fenômeno pode explicar os altos índices de resistência aos azóis apresentados em nossos estudos, sobretudo em espécies de *C. tropicalis*, entretanto a revisão dos perfis de susceptibilidade e a busca de genes mediadores dessas resistências são necessários.

De acordo com as recomendações do último lançamento diretrizes da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) e da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID), a terapia inicial direcionada para pacientes com candidemia ou candidíase invasiva devem ser baseados nas equinocandinas (PAPPAS et al, 2016; BASSETTI et al 2012). Nas diretrizes atualizadas da IDSA, o fluconazol continua sendo uma alternativa valiosa em pacientes selecionados (aqueles que não estão gravemente doentes e aqueles que não afetados por espécies resistentes de *Candida*), enquanto para as diretrizes da ESCMID ele não é a primeira escolha (PAPPAS et al, 2016; BASSETTI et al 2012). Segundo os estudos de Reboli et al, 2007, os quais compararam a ação da anidulafungina sobre o fluconazol foi demonstrada que anidulafungina apresentaram uma resposta geral significativamente melhor (76% vs 60%; P = 0,01), e uma análise post hoc adicional mostrou melhores respostas globais (70,8% vs 54,1%), dados que corroboram nossos estudos quando comparado os dois fármacos a equinocardina apresentou melhor resposta que fluconazol (62% vs 57.2%).

Os dados apresentados neste estudo demonstram que a Micafungina é a equinocandina que apresenta melhor respostas quando comparada as demais, o que está de acordo com Suh et al, 2020 e Van der Geest et al 2016, onde em seus estudos apresentam que a taxa de resposta geral da micafungina é comparável à da anidulafungina. Entretanto apresenta maior segurança e eficácia enquanto monoterapia em pacientes gravemente enfermos com câncer e candidíase invasiva. Além da farmacocinética da micafungina ser bem definida em pacientes não críticos e críticos atingindo um estado estacionário no dia 3, sem a necessidade de uma dose de ataque, em contraste com a caspofungina e a anidulafungina.

Nos estudos de Mora-Duarte et al 2002 a caspofungina foi tão eficaz quanto a anfotericina B desoxicolato em pacientes com candidemia (82,6%), mas significativamente melhor tolerado. Além disso, a caspofungina mostrou eficácia no tratamento de segunda linha de candidíase invasiva ou mucosa em pacientes que eram refratários a outros antifúngicos. Num estudo multicentrico Cornely et al. 2007, observaram a eficácia da caspofungina no tratamento de candidíase profunda como Peritonite ou abscesso por *Candida*, disseminada crônica candidíase e osteomielite. Os pacientes mostraram-se bem taxas de resposta geral de até 80% . Dados que reforçam nosso estudo onde as cepas de *Candida* apresentaram uma resposta de aproximadamente 84% com eficácia semelhante a anfotericina B.

Segundo Nagayoshi et al, 2017, a resistência à anfotericina B parece incomum entre isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, por outro lado, falhas terapêuticas utilizando anfotericina B são bastante documentadas em diversos episódios de infecção fúngica sistêmica (FALCI et al 2015). Relatos sugerem que uma proporção crescente de *C. glabrata* e *C. krusei* pode evidenciar resistência à anfotericina B. Em nosso estudo, dois isolados de *C. glabrata* (14%) apresentaram esse padrão, e em contraste os estudos de Nagayoshi et al 2017, 37% do isolados do Complexo *C. parapsilosis* apresentaram resistência.

Outras leveduras como as gênero *Cryptococcus* e *Trichosporon* não apresentam uma terapêutica bem definida, segundo Arendrup et al, 2014, O gênero *Cryptococcus* é intrinsecamente resistente às equinocandinas. O tratamento é realizado usando Anfotericina B isolada ou em combinação e fluconazol e/ou fluconazol isolado, dados que sustentam nossos achados onde 75% das cepas foram sensíveis a fluconazol e 100% Anfotericina B, 100% resistente a micafungina e anidulafungina em contrates 25% apresentou padrão de sensibilidade a caspofungina. Já para gênero *Trichosporon* sugere que os azólicos é classe de drogas primária para o tratamento da tricosporonose invasiva e várias das espécies são resistentes anfotericina B, dados q corroboram nossos estudos onde os triazólicos apresentaram a melhor resposta frente a cepa estudada. Entretanto para ambos os gêneros são necessários estudos mais aprofundados acerca do perfil de susceptibilidade antifúngica, uma vez que o padrão generalista de tratamento definido para os gêneros tem apresentado discordâncias entre algumas espécies e cepas.

Tabela 4. Perfil de susceptibilidade antifúngica frente as drogas padrões de isolados clínicos de pacientes com levedurosos sistêmicas internados em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais públicos do Recife -PE

Nº	COD.	Microrganismo	Susceptibilidade Antifúngica - µg/mL							
			FLU	ITRA	VORI	CETO	MICA	ANID	CASPO	ANF B
1.	HC 04	<i>C. albicans</i>	0,25	0,03	0,125	0,03	0,03	0,03	0,06	0,5
2.	HC 07	<i>C. albicans</i>	0,25	16	16	0,03	0,03	0,03	0,25	0,5
3.	HC 08.2	<i>C. albicans</i>	0,125	0,03	0,06	0,03	0,03	0,03	0,03	0,5
4.	HC 08.3	<i>C. albicans</i>	0,125	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,5
5.	HC 11	<i>C. albicans</i>	1	0,03	0,5	0,03	0,03	0,03	0,03	0,5
6.	HC 48	<i>C. albicans</i>	0,5	0,03	0,25	0,03	0,03	0,03	0,03	0,5
7.	HC 49	<i>C. albicans</i>	0,5	0,03	0,125	0,03	0,03	0,03	0,03	0,5
8.	HGV 03	<i>C. albicans</i>	1	1	16	0,5	0,03	0,03	0,06	0,25
9.	HGV 16	<i>C. albicans</i>	0,125	16	0,03	1	0,03	0,03	0,125	0,25
10.	HGV 19	<i>C. albicans</i>	1	0,03	0,06	8	0,03	0,06	0,125	0,5
11.	HGV 23.1	<i>C. albicans</i>	8	0,5	2	2	0,03	0,03	0,03	0,5
12.	HGV 23.2	<i>C. albicans</i>	4	1	8	1	0,03	0,03	0,03	0,5
13.	HGV 25	<i>C. albicans</i>	0,125	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,06	0,5
14.	HGV 26	<i>C. albicans</i>	4	4	4	4	0,03	0,03	0,03	0,5
15.	HGV 32	<i>C. albicans</i>	1	0,03	0,125	0,03	2	4	2	0,5
16.	HGV 33.2	<i>C. albicans</i>	0,5	0,03	0,06	0,03	0,03	0,03	0,25	2
17.	HGV 36	<i>C. albicans</i>	2	0,06	8	0,03	0,03	0,03	0,03	1
18.	HGV 46	<i>C. albicans</i>	0,125	0,03	0,25	0,03	0,03	0,125	0,125	0,5
19.	HGV 47	<i>C. albicans</i>	0,125	0,03	0,03	0,25	0,03	0,03	0,06	0,5
20.	HGV 49	<i>C. albicans</i>	0,125	0,03	2	0,06	0,03	0,03	0,03	1
21.	HGV 51	<i>C. albicans</i>	8	1	> 16	0,25	0,125	4	4	0,5
22.	HGV 53.1	<i>C. albicans</i>	32	1	8	2	> 16	> 16	> 16	0,5
23.	HGV 53.2	<i>C. albicans</i>	32	1	8	2	> 16	> 16	> 16	0,5
24.	HC 46	<i>C. glabrata</i>	16	0,03	0,5	0,03	0,03	0,06	0,5	0,5
25.	HGV 10.1	<i>C. glabrata</i>	0,125	0,03	0,03	0,03	0,03	0,25	0,125	0,5
26.	HGV 10.2	<i>C. glabrata</i>	0,125	0,03	0,03	0,03	0,03	0,06	0,25	0,5

27.	HGV 10.3	<i>C. glabrata</i>	2	0,125	2	0,5	0,03	0,25	0,5	0,5
28.	HGV 11	<i>C. glabrata</i>	1	16	16	2	0,03	0,06	0,06	0,5
29.	HGV 14	<i>C. glabrata</i>	1	0,03	0,25	0,03	0,03	0,06	0,5	0,25
30.	HGV 20	<i>C. glabrata</i>	1	0,125	0,25	0,03	0,03	0,5	0,5	1
31.	HGV 30	<i>C. glabrata</i>	2	0,03	0,125	0,03	0,03	0,125	0,25	2
32.	HGV 43	<i>C. glabrata</i>	0,125	0,03	0,25	0,03	0,03	0,25	0,25	2
33.	HGV 57.1	<i>C. glabrata</i>	> 64	0,125	1	0,125	16	16	16	1
34.	HGV 57.2	<i>C. glabrata</i>	0,125	0,03	1	0,03	0,03	0,125	0,5	1
35.	HGV 58	<i>C. glabrata</i>	0,5	0,125	0,5	0,03	0,25	4	1	0,5
36.	HGV 59	<i>C. glabrata</i>	0,25	0,03	0,25	0,03	0,03	0,06	0,125	1
37.	HGV 15	<i>C. haemulonii</i>	2	0,03	0,125	0,03	0,03	0,06	0,06	1
38.	HGV 06	<i>C. metapsilosis</i>	4	0,03	0,5	0,03	0,5	4	16	0,5
39.	HC 01	<i>C. parapsilosis</i>	2	0,03	0,5	0,03	2	16	2	1
40.	HC 27	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,125	0,03	0,03	4	2	2	2
41.	HC 30	<i>C. parapsilosis</i>	8	0,125	0,5	0,03	4	8	2	1
42.	HC 38	<i>C. parapsilosis</i>	4	0,03	0,25	0,03	2	8	1	0,25
43.	HGV 01.1	<i>C. parapsilosis</i>	8	0,03	0,5	0,03	2	16	4	2
44.	HGV 01.2	<i>C. parapsilosis</i>	4	0,03	0,5	0,03	2	16	4	1
45.	HGV 04	<i>C. parapsilosis</i>	4	0,03	0,5	0,03	2	8	4	2
46.	HGV 07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,03	0,06	0,03	2	4	4	1
47.	HGV 12	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	0,03	0,03	0,03	2	8	4	2
48.	HGV 18	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,03	0,25	0,03	0,5	4	2	1
49.	HGV 24.1	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,03	0,06	0,03	1	4	1	2
50.	HGV 24.2	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,03	0,06	0,03	1	4	1	1
51.	HGV 28	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,03	0,125	0,03	1	4	2	2
52.	HGV 29	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,03	0,125	0,03	2	4	2	1
53.	HGV 33.1	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,03	0,125	0,03	1	4	2	2
54.	HGV 41	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	0,03	0,25	0,03	0,5	4	2	0,5
55.	HGV 54.1	<i>C. parapsilosis</i>	8	0,5	2	0,03	8	16	1	0,5
56.	HGV 54.2	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,03	0,125	0,03	8	1	1	0,5
57.	HC 32	<i>C. tropicalis</i>	1	0,06	0,25	0,03	4	16	16	0,25
58.	HC 47	<i>C. tropicalis</i>	> 64	> 16	> 16	2	0,03	0,03	0,03	0,5

59.	HC 50	<i>C. tropicalis</i>	> 64	> 16	> 14	1	0,03	0,06	0,25	0,5
60.	HGV 08	<i>C. tropicalis</i>	2	16	16	0,03	0,03	0,03	0,125	0,5
61.	HGV 09	<i>C. tropicalis</i>	0,5	0,03	0,5	0,03	0,03	0,125	0,03	0,5
62.	HGV 13	<i>C. tropicalis</i>	1	0,03	4	0,03	0,03	0,25	0,5	0,5
63.	HGV 17.1	<i>C. tropicalis</i>	4	8	0,5	1	0,06	0,125	0,06	0,25
64.	HGV 17.2	<i>C. tropicalis</i>	1	0,03	0,25	0,03	0,03	0,03	0,06	0,25
65.	HGV 17.3	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,03	0,25	0,03	0,03	0,5	0,25	0,5
66.	HGV 21	<i>C. tropicalis</i>	2	0,06	16	1	0,03	0,06	0,25	0,5
67.	HGV 27	<i>C. tropicalis</i>	1	0,03	0,5	0,03	0,03	0,06	0,06	0,5
68.	HGV 31	<i>C. tropicalis</i>	16	4	> 16	1	0,03	0,03	0,06	1
69.	HGV 34	<i>C. tropicalis</i>	> 64	> 16	> 16	4	0,03	0,03	0,03	1
70.	HGV 35	<i>C. tropicalis</i>	2	0,03	0,5	0,03	0,03	0,03	0,03	0,5
71.	HGV 37	<i>C. tropicalis</i>	1	0,03	0,25	0,03	0,03	0,03	0,03	1
72.	HGV 39.1	<i>C. tropicalis</i>	> 64	8	>16	1	0,03	0,03	0,03	0,25
73.	HGV 39.2	<i>C. tropicalis</i>	8	16	16	1	0,03	0,03	0,03	0,5
74.	HGV 40	<i>C. tropicalis</i>	16	16	16	2	0,03	0,03	0,03	2
75.	HGV 42	<i>C. tropicalis</i>	64	16	16	1	0,03	0,125	0,5	0,25
76.	HGV 44	<i>C. tropicalis</i>	64	16	16	2	0,03	0,03	0,06	0,5
77.	HGV 45	<i>C. tropicalis</i>	64	16	16	1	0,03	0,125	0,125	0,125
78.	HGV 48	<i>C. tropicalis</i>	32	8	8	2	0,03	0,03	0,06	0,5
79.	HGV 50	<i>C. tropicalis</i>	0,125	0,03	0,25	0,5	0,03	0,125	0,06	0,5
80.	HGV 55	<i>C. tropicalis</i>	8	0,5	1	2	0,25	4	8	0,125
81.	HGV 22.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	0,03	0,25	0,03	16	16	16	0,5
82.	HGV 22.2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	0,03	0,5	0,03	16	16	16	0,25
83.	HGV 38	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,125	0,03	0,125	0,03	8	8	1	0,06
84.	HGV 56	<i>Cryptococcus neoformans</i>	64	0,125	4	0,125	> 16	16	16	1
85.	HGV 02	<i>Kodamaea ohmeri</i>	2	0,03	0,25	0,03	4	4	8	0,5
86.	HGV 52	<i>Kodamaea ohmeri</i>	32	8	> 16	4	1	8	16	0,5
87.	HGV 05	<i>Trichoporon inki</i>	2	0,06	0,25	0,25	16	16	16	2

FLU = Fluconazol, ITRA = Itraconazol, VORI = Voriconazol, CETO = Cetoconazol, MICA = Micafungina, ANID = Anidulafungina, CASPO = Caspofungina, ANF B = Anfotericina B

	Sensível		Dose dependente		Resistente
--	----------	--	-----------------	--	------------

5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO

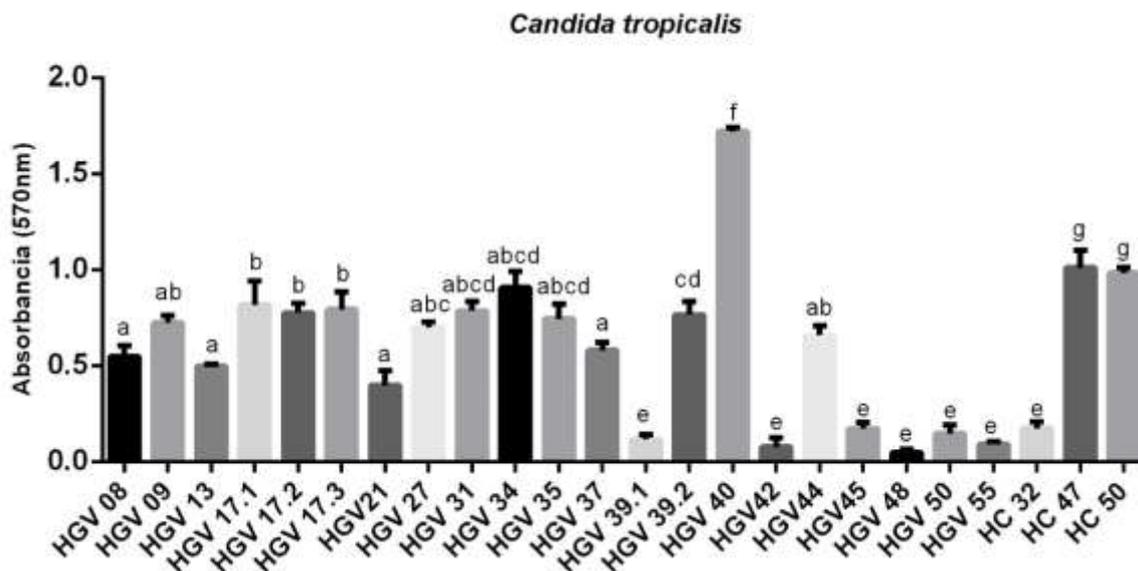


Figura 7 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de *Candida tropicalis*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie.

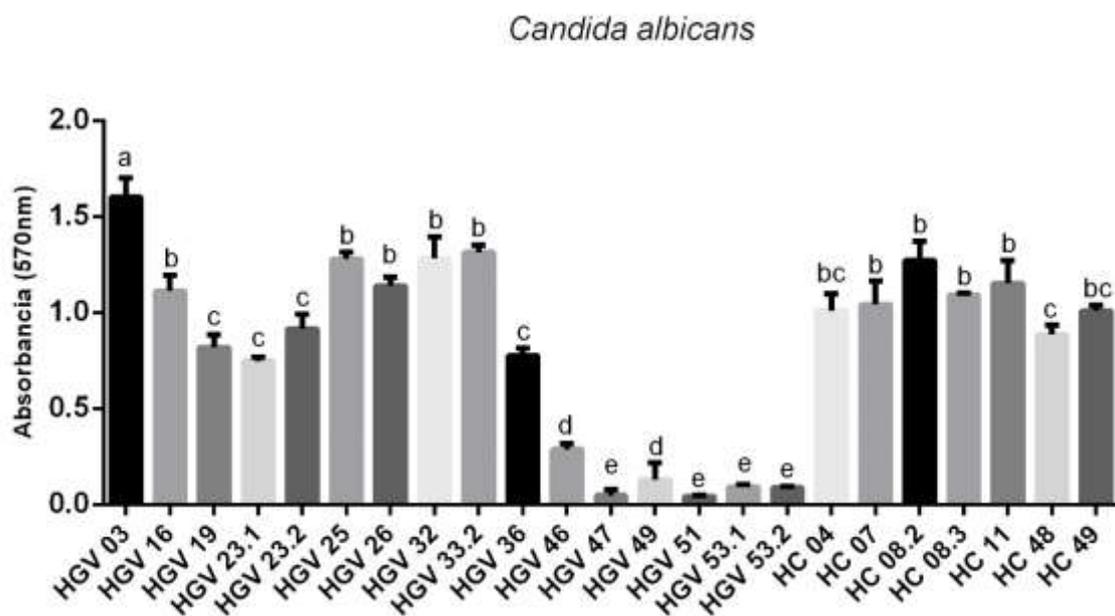


Figura 8 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de *Candida albicans*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie.

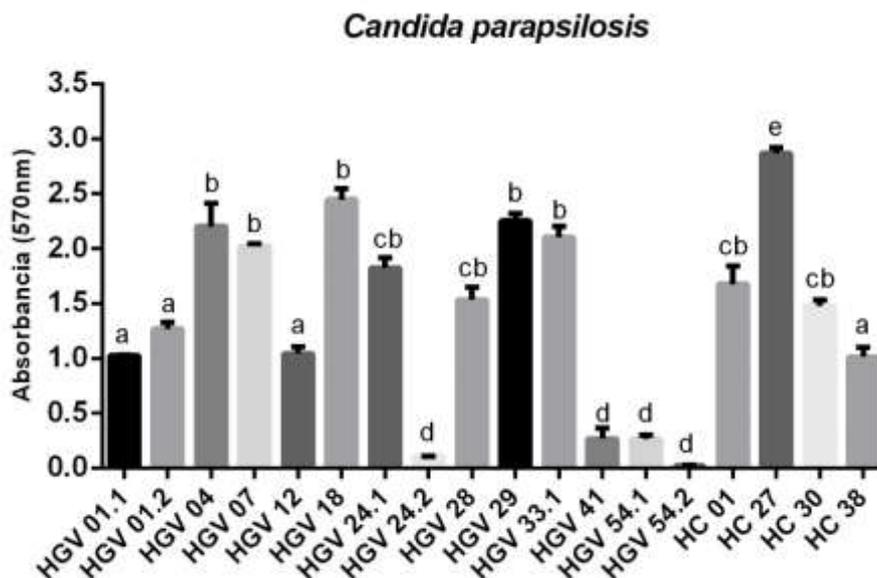


Figura 9 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de *Candida parapsilosis*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie.

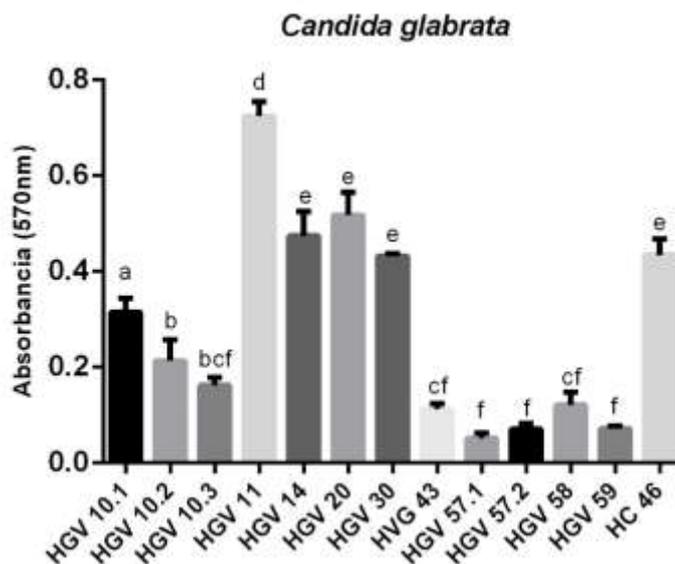


Figura 10 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de *Candida glabrata*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie.

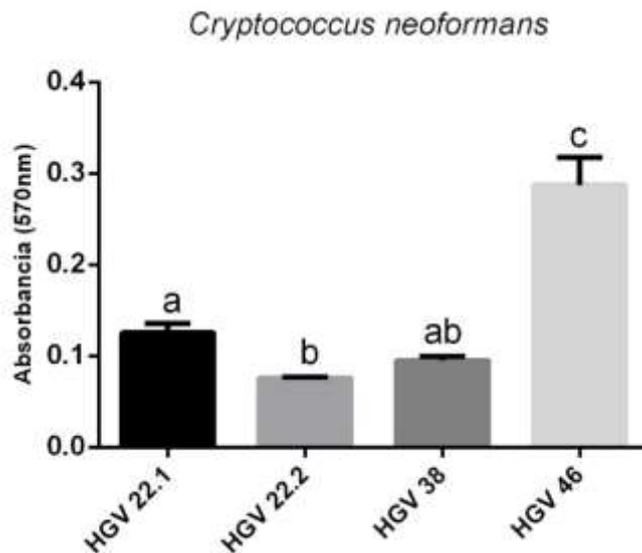


Figura 11 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na produção do biofilme dentro de uma mesma espécie.

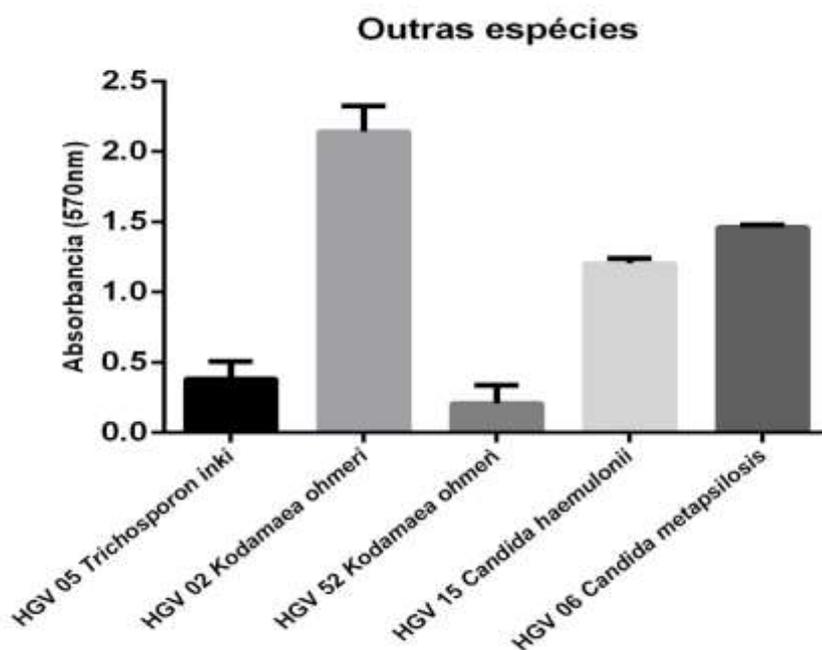


Figura 12 - Atividade oxidativa da produção de biofilme por isolados clínicos de *Trichosporon inkin*, *kodamaea ohmeri*, *C. haemulonii* e *C. metapsilosis*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$).

A clivagem do MTT tem várias propriedades desejáveis para o ensaio de sobrevivência e proliferação celular. O MTT é clivado por todas as células vivas e metabolicamente ativas, mas não por células mortas ou eritrócitos. A quantidade de formazan gerado é diretamente proporcional ao número de células em uma ampla faixa, usando uma população de células homogênea. As células ativadas produzem mais formazan do que as células em repouso, o que poderia permitir a medição da ativação mesmo na ausência de proliferação. Essas propriedades são todas consistentes com a clivagem do MTT apenas por mitocôndrias ativas (MOSMANN, 1983). Em nossos estudos a utilização do MTT foi essencial para quantificação dos biofilmes das diferentes espécies de leveduras metabolicamente ativas, sendo todos isolados capazes de forma biofilmes em diferentes intensidades, demonstrando que a virulência está diretamente ligada a cepa e não ao gênero ou espécies.

Entre as espécies os biofilmes apresentam padrões diferentes de acordo com a origem ou material, nos estudos de Seneviratne et al 2008, os biofilmes de *C. albicans* são mais fluídos em tecidos infectados que os biofilmes de outras espécies de *Candida*. Na superfície de plástico, exibem uma rede densa de leveduras e células filamentosas. *C. albicans* também é considerada o maior produtor de biofilme entre as espécies de *Candida*. Biofilmes de *C. glabrata* exibem uma matriz extracelular com altos níveis de carboidratos e proteínas, enquanto *C. parapsilosis* a estrutura do biofilme pode variar de acordo com a cepa, mas geralmente compreende morfologias de leveduras e pseudo-hifas, produzindo uma multicamada compacta. *C. tropicalis*, estudos revelaram uma estrutura composta principalmente por células em forma de levedura, embora algumas cepas tenham exibido formas filamentosas, embora uma matriz com baixo teor de carboidratos e proteínas, são mais resistentes ao desprendimento da superfície do que aqueles formados por *C. albicans*. Ao comparar a produção de biofilme por *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* isolados de sangue com isolados, uma produção significativamente maior é observada nos primeiros isolados para todas as espécies, exceto para *C. tropicalis*. Em nossos estudos podemos observar essa diferença de produção entre as espécies, sendo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata* os melhores produtores respectivamente, diferentemente dos estudos apresentados *C. tropicalis* demonstrou uma capacidade de formação de biofilme igual ou superior a *C. albicans*, entretanto estudo mais aprofundados acerca de produção de biofilme, matriz extracelular e diferentes materiais são necessários para melhor compreensão deste fator de virulência.

Quando observado a formação de biofilme pelo isolados de *Cryptococcus* podemos constatar que todos foram capazes de produzir biofilme com intensidades diferentes, dados q corroboram os estudos Martinez et al 2015, onde as características do desenvolvimento do biofilme de *C. neoformans* foram descritas usando um modelo de placa de microtitulação, e formação de biofilme por este fungo exibiu fases coordenadas, como fixação de superfície, formação de microcolônia, produção de matriz extracelular e maturação.

T. inkin também foi capaz de produzir biofilmes assim como estudos de Cordeiro et al 2015 onde observaram a produção de biofilme por espécies de *T. inkin*, as quais apresentam maior virulência e maior capacidade de formar biofilmes dentro o gênero.

5.4 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICAS DE ISOLADOS MELHORES PRODUTORES DE BIOFILME FRENTE A DROGAS PADRÕES E DERIVADO SINTÉTICO DE CUMARINA

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade antifúngicos frente as drogas padrões e cumarina de leveduras melhores produtores de biofilmes

COD.	Microrganismo	Susceptibilidade Antifúngica - µg/mL			
		FLU	CASP	ANF	CUM
1. ATCC 90028	<i>C. albicans</i>	0,125	2	0,5	256
2. HGV 03	<i>C. albicans</i>	1	0,06	0,25	256
3. HGV 11	<i>C. glabrata</i>	1	0,06	0,5	512
4. HGV 15	<i>C. haemulonii</i>	2	0,06	1	256
5. HC 27	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	2	2	512
6. HGV 40	<i>C. tropicalis</i>	16	0,03	2	512
7. HGV 22.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	16	0,5	256
8. HGV 02	<i>Kodamaea ohmeri</i>	2	8	0,5	256

5.5 TRATAMENTO DE BIOFILME FÚNGICO

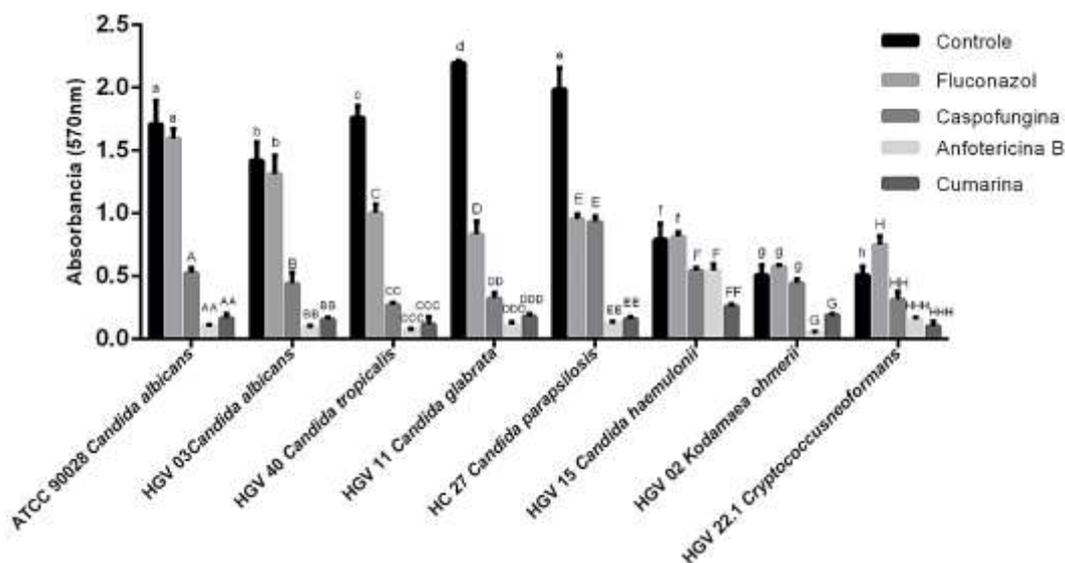


Figura 13 - Atividade oxidativa do tratamento de biofilme por leveduras clínicas com Fluconazol, Caspofungina, Anfotericina B e Cumarina. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante o tratamento do biofilme em dois experimentos independentes, em duas condições distintas com pelo menos três repetições ($n \geq 12$). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Letras maiúsculas, minúsculas e repetidas indicam diferença significativa no tratamento do biofilme dentro de uma mesma espécie

A resistência antifúngica por muitas vezes está associada a expressão de fatores de virulência como a formação de biofilme. A aquisição de resistência durante a formação de biofilme foi observada em um estudo onde biofilmes de 48 h de *C. albicans* os quais exibiram resistência cinco a oito vezes maior a todos os antifúngicos quando comparados às células planctônicas. A resistência aumentada exibida por biofilmes de *C. parapsilosis* ao fluconazol, voriconazol, ravuconazol, anfotericina B, nistatina, clorexidina e terbinafina também foi registrada (KUHN et al 2002). A maioria dos estudos concordam que os azóis são os agentes antifungicos que apresentam fraca atividade contra biofilmes de espécies de *Candida*, ambos biofilmes *Candida albicans* (NWEZE et al 2012; KANEKO et al 2010) e biofilmes *Candida* não-*C. albicans* (isto é, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) (NWEZE et al 2012; MELO et al 2011). Embora o fluconazol tenha sido extensivamente o azol mais estudado, estudos com outros azóis como voriconazol e itraconazol (MELO et al 2011; UPPULURI et al 2011; SEIDLER et al 2010) concluir da mesma maneira. Ramage et al (2002), mostraram que biofilmes pré-formados não foram afetados por altas concentrações de fluconazol (> 1024 mg / l) (CUELLAR-CRUZ et al 2012). Em nosso estudo também observamos que fluconazol foi ineficaz no tratamento de *C. albicans*, *Cryptococcus neoformas*, além das espécies emergentes *C. haemulonii* e *Kodamaea ohmeri*, em contrapartida apresentou atividade para *C. glabrata* e *C. parapsilosis* e atividade reduzida para *C. tropicalis*, neste sentido nossos corroboram os estudos aqui apresentados no que diz respeito a *C. albicans* onde observamos a resistência intrínseca ao referido antifungico, porém o padrão para espécies de *Candida* não-*C. albicans* ainda é indeterminado, sugerindo estudo mais aprofundados sobretudo para espécies emergentes.

Estudos tem demonstrado uma atividade notável para caspofungina, micafungina (FERREIRA et al 2009) e anfotericina B (DIDONE et al 2011), contra isolados de *C. albicans* e *Candida* não-*C. albicans*. Ramage et al (2002) investigaram as relações temporais de fluconazol, anfotericina B desoxicolato, e caspofungina contra biofilmes pré-formados de *C. albicans in vitro*. Eles mostraram que o fluconazol exibiu pouco ou nenhuma atividade contra os organismos sésseis ao longo de 48 h. A anfotericina B e a caspofungina, no entanto, foram ambas ativas contra as células sésseis. Cada um era dependente da concentração, exibindo atividade aumentada em concentrações mais altas. Kuhn et al (2002) usaram um modelo de bioprótese para observar o atividade de vários agentes antifúngicos diferentes *in vitro* contra biofilmes pré-formados de espécies de *Candida*. Seus experimentos demonstraram uma boa atividade de equinocandinas e formulações lipídicas de anfotericina B contra biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Em um estudo *in vitro* Bachman et al (2002) mostrou uma redução > 97% da atividade metabólica das células sésseis em biofilmes pré-formados quando expostos a caspofungina durante 48h em comparação com biofilmes não expostos. A microscopia

eletrônica de varredura revelou que o próprio ECM foi danificado e que a maioria das células dentro da matriz estavam mortas, embora a erradicação completa do biofilme nunca fosse alcançada. Lazzell et al (2009) demonstraram a eficácia da caspofungina para o tratamento e prevenção de biofilmes *C. albicans in vivo*. Por outro lado, Ferreira et al relataram um menor atividade da caspofungina contra cepas de *C. parapsilosis* e um efeito paradoxal para cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Nossos dados demonstram que caspofungina apresentou uma atividade frente aos biofilmes das espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. haemulonii* e *Cryptococcus neoformans* e assim como os estudos de Ferreira et al (2009) *C. parapsilosis* apresentou um padrão semelhante a fluconazol, apresentando atividade reduzida, de igual modo esse padrão foi observado para cepa de *Kodamaea ohmeri*, quando os observados os padrões de anfotericina B podemos constatar a eficácia deste fármaco frente aos biofilmes de todas as espécies testadas, sendo dos antifúngicos disponível a melhor escolha para tratamento de biofilmes formados por leveduras clínicas.

No presente estudo, demonstramos que a escoparone 6,7-Dimethoxycoumarin (Cumarina), tem uma propriedade antifúngica e é eficaz contra biofilmes de leveduras clínicas com padrões semelhantes aos apresentados pela Anfotericina B, entretanto não apresenta os efeitos citotóxicos inerentes a este fármaco, Lemos et al, (2020) demonstraram as atividades das cumarinas naturais frente a biofilmes pré-formados de *C. tropicalis* podendo afetar a taxa de crescimento, bem como a formação dessas estruturas complexas. Neste sentido, entendemos que a busca por alternativas, sejam elas, naturais ou sintéticas, para tratamento de biofilme são essenciais para o estabelecimento de novos padrões terapêuticos, uma vez que as leveduras estão emergindo como importantes patógenos humanos, e os biofilmes fúngicos apresentando níveis intrínsecos de resistência contra a maioria dos agentes antifúngicos, neste sentido nossos resultados destacam a escoparone 6,7-Dimethoxycoumarin com potencial aplicação para prevenção e proliferação de biofilme de espécies de leveduras.

6. CONCLUSÕES

- Maldi TOF MS é uma técnica rápida e precisa para identificação de agentes de leveduras;
- Técnicas automatizadas (VITEK® e BD Phoenix) de identificação apresentam dados poucos consistentes;
- *Candida tropicalis* é a espécie de *Candida* não-*C. albicans* mais isoladas em Unidades de terapia intensiva do Recife-PE;
- Isolamento de espécies de *Candida* não-*C. albicans* é superior as espécies de *C. albicans* em Unidades de terapia intensiva do Recife-PE;
- *Trichosporon inkin* está associado a casos graves e fatais de fungemia em paciente com ausência de neoplasias hematológicas;
- Micafungina é a droga de escolha para tratamento de candidemia, apresentando baixos índices de resistência;
- *Candida tropicalis* apresentam altos índices de resistência ao fluconazol;
- Leveduras clínicas do gênero *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* são capazes de formar biofilmes de grau e intensidade diferentes;
- Espécies de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata* são bons produtores de biofilmes;
- Escoparone 6-7dimethoxicumarina apresenta eficácia no tratamento de biofilmes formados por leveduras clínicas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A.A.; BISHR, M.; EL-SHANAWANY, M.A.; ATTIA, E.Z.; ROSS, S.A.; PARÉ, P.W. 2005. Rare trisubstituted sesquiterpenes daucanes from the wild *Daucus carota*. *Phytochemistry*. 66:1680-1684.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO et al. 2015. Susceptibility Test For Fungi: Clinical And Laboratorial Correlations In Medical Mycology. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*. 19(Suppl 19):57-64
- ALEXANDER, BD et al. 2005. *Candida glabrata* fungemia in transplant patients receiving voriconazole after fluconazole. *Transplantation*. 80:868–871.
- AL-FATTANI, M.A. AND DOUGLAS, L.J. 2006 Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal Medicine Microbiology*. 55: 999–1008
- ALIM, D.; SIRCAIK, S.; PANWAR, S.L. 2018. The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: an emerging perspective. *Journal Fungi*. 4: 4: 2–18.
- ALMEIDA, et al. 2012. First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. *Medical Mycology*. 67:1229-1231.
- ANVISA. 2013. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica. *Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)*: Brasília – BRASIL.
- ARATHOON, et al. 2002. Randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 46: p.451-7.
- ARENDRUP, M. C. et al. 2014. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 20: S3:76–98.
- ASADA N, et al. 2006. Successful treatment of breakthrough *Trichosporon asahii* fungemia with voriconazole in a patient with acute myeloid leukemia. *Clinical Infectious Diseases*. 43:39–41.
- BAILLIE, G. S., AND L. J. DOUGLAS. 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal Medicine Microbiology*. 48:671–679.
- BALLUFF, B., et al. 2011. MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: technological advancements and recent applications. *Histochemistry and Cell Biology*, 136(3):227-44

- BARNETT JA, PAYNE RW, YARROW D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn. Cambridge University Press: Cambridge.
- BASSETTI, M. et al. 2014. A multicenter study of septic shock due to candidemia: Outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Medicine*. 40: 839–845.
- BASSETTI, M. et al. 2017. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive care medicine*. 43:1225–1238.
- BENNETT, J. E.; POWERS, J.H. 2018. Candidemia in the ICU. *Critical Care Medicine*. 46:3:482-483.
- BERKOW EL and LOCKHART SR. 2017. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and Drug Resistance*. 31;10:237-245.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11: 127-152.
- BLANKENSHIP JR AND MITCHELL AP 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *current opinion microbiology*. 9: 588-594.
- BONFIETTI, L.X et al. 2012. Ten-Year Study of Species Distribution and Antifungal Susceptibilities of *Candida* Bloodstream Isolates at a Brazilian Tertiary Hospital. *Mycopathologia*. 174:389–396.
- BRIZENDINE KD, BADDLEY JW, PAPPAS PG. 2011. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir critical care medicine*. 32(6):727-34.
- BUTLER, G AND RASMUSSEN, M.D., et al. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 459: 657-662.
- CALVO B et al. 2016. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *Journal Infection*. 73(4):369-74
- CAMPBELL CK et al. 1985. Cryptococcal latex antigen test positive in patient with *Trichosporon beigeli* infection. *Lancet*. 2:43–44.
- CANTON, E.; VIUDES, A.; PEMAN, J. 2001. Systemic nosocomial infection by yeasts. *Revista iberoamericana micologia*. 18:51-5.
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. 2018. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine*, 5:1-15.
- CÉSPEDES, C.L.; ÁVILA, J.G.; MARTÍNEZ, A.; SERRATO, B.; CALDERÓN-MUGICA, J.C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:3521-3527.
- CHAGAS-NETO TC et al. 2009. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA

- iintergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *Journal Clinical Microbiology*. 47: 1074–1081.
- CHAKRABARTI, A. et al. 2015. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Medical*. 41:285–295
- CHARLIER C. et al F. 2009. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection immunity*. 77:120–127
- CHEN, S. C et al. 2009. Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. *Clinical Microbiology Infectious*. 15:662-9.
- CHIMENTI, F.2010. Synthesis, selective anti-*Helicobacter pylori* activity, and cytotoxicity of novel N-substituted-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxamides. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters***.20:4922-4926.
- CHIMICHI, S. et al. 2002. New geiparvarin analogues from 7-(2-oxoethoxy) coumarins as efficient *in vitro* antitumoral agents. *Tetrahedron Letters*.43:7473-7476.
- CHITASOMBAT MN et al. 2012. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *Journal Infectious*. 64: 68–75.
- CHO, Y.T., et al., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clinica Chimica Acta*, 415:266-75.
- CHONG, P.P et al. 2006. Recurrent candidaemia in a neonate with Hirschsprung's disease: fluconazole resistance and genetic relatedness of eight *Candida tropicalis* isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 55: 423-428.
- CHOWDHARY N. 2014. The methods and outcomes of cultural adaptations of psychological treatments for depressive disorders: a systematic review. *Psychol Medical*. 44(6):1131-46
- CLANCY CJ. 2017. Emergence of *Candida auris*: An International Call to Arms. *Clinical Infectious Diseases*. 64:2:15:141–143,
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, 2008.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; CLSI document M27-S4. CLSI, Wayne, PA, 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; CLSI document M60. CLSI, Wayne, PA, 2017.
- COGLIATI, M et al. 2001. Origin of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* diploid strains. *Journal Clinical Microbiology*. 39: 3889-3894.

- COL, A. P. et al. 2009. Identificação das leveduras do gênero *Candida* pelo método cromógeno CHROMagar® *Candida* obtidas de pacientes com infecção das vias urinárias. RBAC, Paraná, vol. 41, n.4, p.279 – 281.
- COLEMAN, D.C et al. 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology*. 36: 156-65.
- COLOMBO A.L et al. 2014. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter centers sequentially conducted over a 9-year Period. *Intensive Care Medicine* 40:1489–98.
- COLOMBO A.L et al. 2017. *Candida* and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer. *The Lancet infectious diseases*. 344-e356
- COLOMBO AL, PADOVAN AC, CHAVES GM. 2011. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. *Clinical microbiology reviews*.24: 682–700.
- COLOMBO, A. L et al. 2003. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology*. 41: 235-239.
- COLOMBO, A.L. AND GUIMARÃES, T. 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 599-607.
- CONEP - Ministério da Saúde Resolução nº 466/2012, 1-12. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>>
- CORDEIRO RA et al. 2015. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. *Journal of Medical Microbiology*. 64:1277–1286
- CORNELY OA et al. 2007. Caspofungin for the treatment of less common forms of invasive candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.60:363–9.
- COSTA AC et al. 2013. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed *in vitro*. *Mycoses* 56: 614-622.
- COUTINHO, L. R. P et al. 2015. Acolhimento na Atenção Primária à Saúde: revisão integrativa. *Saúde em Debate*. 39: 105:514–524.
- CROXATTO, A., G. PROD’HOM, AND G. GREUB. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 36(2):380-407.
- CUELLAR-CRUZ M, et al. 2012. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 31(10):2513-2527.
- D’ENFERT, C. 2006. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agentes. *Current drug targets*. 7:465–470.

- DA MATTA, D. A et al. 2007. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagnostic Microbiol Infectious Diseases*. 57:399-404.
- DA SILVA WJ et al. 2012. Exopolysaccharide matrix of developed *Candida albicans* biofilms after exposure to antifungal agents. *Brazilian Dental Journal*. 23: 716-722.
- DE HOOG et al. 2000. The Atlas of Clinical Fungi. *Journal of Organic Chemistry*.
- DE LOGU, A.; SADDI, M.; CARDIA, M. C.; BORGNA, R.; SANNA, C.; SADDI, B.; MACCIONI, E. In vitro activity of 2-cyclohexylidenedihydro-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55: 692-698, 2005.
- DE PAUW, B., et al 2008. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases* 46 (12):1813–1821.
- DE SOUSA AFL, OLIVEIRA LB, MOURA MEB. 2016. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares causadas por procedimentos invasivos em unidade de terapia intensiva. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*. 2(1-2):11-7.
- DE SOUSA et al. 2014. Hemoculturas positivas de pacientes da unidade de terapia intensiva de um hospital escola de Goiânia – GO, entre 2010 e 2013. *Estudos Goiânia*. 4(3):627-635.
- DERESINSKI SC, STEVENS DA. 2003. Caspofungin. *Clinical Infectious Diseases*. 6:1445-57.
- DEXEUS, F.H et al. 1990. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 8:325-329.
- DIDONE L, OGA D, KRYSAN DJ. 2011. A novel assay of biofilm antifungal activity reveals that amphotericin B and caspofungin lyse *Candida albicans* cells in biofilms. *Yeast*. 28(8): 561-568.
- DIEKEMA, D.J et al. 2002. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *Journal Clinical Microbiology*. 40: 1298–1302.
- DOI, A. M. et al. 2016. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS ONE*. 1–9.
- DORIA, A. et al. 2016. Estudo comparativo de hemoculturas e cateteres positivos para leveduras do gênero *Candida* de origem hospitalar. *Revista Univap*.
- DORIA, A.C.O.C et al. 2015. Comparative study of blood cultures and catheters which were positive for yeast of the genus *Candida* from hospital origin. *Revista Univasp*. 21:8.

- DOUGLAS, J.L. 2004. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*. 11: 30-36,
- DROMER F et al. 1996. "Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. French Cryptococcosis Study Group," *Clinical Infectious Diseases*, 23: 91–96.
- DUPONT, B. 2010. Micafungine.. *Journal of Medical Mycology*. 20: 194-205.
- ESPINEL-INGROFF A. 1998. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK- 0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *Journal Clinical Microbiology*. 36:2950-6.
- ESTES, K. E.; PENZAK, S. R.; CALIS, K. A.; WALSH, T. J. 2009. Pharmacology and antifungal properties of anidulafungin, a new echinocandin. *Pharmacotherapy*. v. 29: p. 17-30.
- FALCI DR, DA ROSA FB, PASQUALOTTO AC. 2015. Comparison of nephrotoxicity associated to different lipid formulations of amphotericin B: a real-life study. *Mycoses*. 58(2):104-12.
- FANNING, S AND MITCHELL, A.P. 2012. Fungal Biofilms. *PLoS Pathog*. 8(4): e1002585
- FATMA, M.A.B.; ELTAYEB, E.A. 2004. Antifungal compounds from induced *Conium maculatum* L. plants. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32:1097-1108.
- FEKKAR A et al. 2009. Serum cross-reactivity with *Aspergillus* Galactomannan and Cryptococcal antigen during fatal disseminated *Trichosporon dermatis* infection. *Clinical Infectious Diseases* 49: 1457–1458.
- FERREIRA JA, CARR JH, STARLING CE, DE RESENDE MA, DONLAN RM. 2009. Biofilm formation and effect of caspofungin on biofilm structure of *Candida* species bloodstream isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 53(10):4377-4384.
- FINKEL JS AND MITCHELL AP. 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *National Revist Microbiol* 9: 109-118.
- FOURNIER S et al. 2002. Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukaemia. *Europe Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases* 21:892–896.
- FOX, E.P. et al. 2015. An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. *Molecular Microbiology*. 96:1226–399,
- FRANZOT, SP, SALKIN, IF, CASADEVALL, A. 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal Clinical Microbiology*. 37: 838-840.
- FREIMOSER, F.M.; JAKOB, C.A.; AEBI, M.; TUOR, U. 2005. The MTT [3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl. Environ. Microbiol*. 1999, 65: 3727-3729.

- GALBAN, B AND MARISCAL, F. 2006. Epidemiology of candidemia in ICU. *Revista Iberoamericana de Micología*. 23:12-5.
- GIBSON JF AND JOHNSTON SA. 2015. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetic Biology*. 78:76-86
- GIL ML, MURCIANO C, YANEZ A, GOZALBO D. 2016. Interdisciplinar I, Biotecmed ERI, et al. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections Burjassot , Spain , 3 **Board of Governors Regenerative Medicine Institute and Research Division** of.;278–302.
- GIOLO, MP AND SVIDZINSKI, TIE 2014. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial*. 46:225-234,
- GIRMENIA C et al. 2005. 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. 43: 1818–
- GONÇALVES, S.S et al. 2010. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of *Candidaemia* in Brazil. *Clinical Microbiology Infectious*.16 (7): 885-7.
- GUEHO, E et al.1994. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses*. 37: 3-10.
- GUINEA, J et al.2008. *In vitro* antifungal activities of isavuconazole (BAL4815), voriconazole, and fluconazole against 1,007 isolates of *zygomycete*, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 52: 1396-400.
- HAGEN F et al. 2017. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. *Clinical Science and Epidemiology*. 2:00238-17
- HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect. Immun* 62: 915-21, 1994.
- HOBSON, R.P. 2003. The global epidemiology of invasive *Candida* infections is the tide turning? *Journal Hospital Infection* 55: 159-68.
- HOGAN D. 2006. Quorum sensing: alcohols in a social situation. *Current Biology*. 20:16(12):R457-8.
- HONG NGUYEN et al. 2010. “Outcomes of central nervous system cryptococcosis vary with host immune function: results from a multi-center, prospective study,” *Journal of Infection*. 61: 419–426.
- HOSOKI K et al. 2008. Early detection of breakthrough trichosporonosis by serum PCR in a cord blood transplant recipient being prophylactically treated with voriconazole. *Journal Pediatric Hematologic Oncologic* 30: 917–919.

- HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potencial. *General Pharmacology*. 27:713-722.
- HOY J et al. 1986. *Trichosporon beigeli* infection: a review. *Revist Infectius Disesseas*. 8: 959–967.
- INFANTE-LÓPEZ, M. E AND ROJO-CONEJO, P. 2009. Utilidad clínica de la micafungina en el tratamiento de las candidiasis invasoras en el neonato. *Revista Iberoamericana de Micología*. 26:56-61.
- IRANSHAHI, M.; HOSSEINI, S.T.; SHAHVERDI, A.R.; MOLAZADE, K., KHAN, S.S.; AHMAD, V.U. 2008. Diversolidos A-G, guaianolides from the roots of *Ferula diversivittata*. *Phytochemistry*. 69: 2753-2757.
- JIMENEZ-OROZCO, F.A et al. 199. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Research*. 9:243-247.
- KANBE, T. et al. 2002. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast*. 19:973-89.
- KANEKO Y, et al. 2010. Anti-*Candida*-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90-related stress responses. *Medical Mycology*. 48(4):606-612.
- KATRAGKOU, A et al. 2007. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52:357–360
- KAUFFMAN, C. A., PAPPAS, P.G., SOBEL, J.D., DISMUKES, W.E. 2011. *Essentials of Clinical Mycology*. Springer, ISBN 1441966390.
- KOFINAS, C.; CHINOU, I.; LOUKIS, A.; HARVALA, C.; MAILLARD, M. 1998. Flavonoids and bioactive coumarins of *Tordylium apulum*. *Phytochemistry*.48:637-641.
- KONTOYIANNIS et al. 2004. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum, and determinants of outcome. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. v. 36, p. 564-569.
- KRCMERY, V AND BARNES, A. J. 2002. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*. 50: 243-60.
- KROGH-MADSEN et al. 2006. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clinical Infectious Diseases*. 42:938-44.
- KROM, B. P.; COHEN, J. B.; FESER, G. E. M.; CIHLAR, R. L. 2007. Optimized candidal biofilm microtiter assay. *J. Microbiol. Methods*, 68: 421-423.
- KRZOSSOK S, BIRCK R, HENKE S, HOF H, VAN DER WOUDE FJ, BRAUN C. 2004. *Trichosporon asahii* infection of a dialysis PTFE arteriovenous graft. *Clinical Nephrology*. 62: 66– 68.

- KUHN DM et al, 2002. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:1773–80.
- KUHN, D.M et al. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infectious Immunity*, 70: 878-888.
- KWON-CHUNG K J et al . 2017. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere.* 2 :00357-16
- KWON-CHUNG, K.J., T. Boekhout, J.W. Fell and M.R. Diaz. 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51: 804–806.
- KWON-CHUNG, KJ AND VARMA, A. 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.* 6:574–587.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica, 9ª ed., São Paulo, Sarvier, 2002
- LAKE, B.G. 1999. Investigations into the mechanism of coumarins induced-hepatotoxicity in rats. *Food Chemistry Toxicology.* 37:423-454.
- LAMOTH F, LOCKHART SR, BERKOW EL, CALANDRA T. 2018.Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *Journal Antimicrob Chemother.*;73:i4–13
- LAZZELL AL, et al. 2009. Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 64(3):567-570.
- LEHMANN, P. F.; LIN, D.; LASKER, B. A. 1992.Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology.* 30:3249-54
- LEMOS ASO, et al. 2020. Antifungal Activity of the Natural Coumarin Scopoletin Against Planktonic Cells and Biofilms from a Multidrug-Resistant *Candida tropicalis* Strain. *Frontiers in Microbiology.* 2020.01525.
- LIAO Y, HARTMANN T, AO JH, YANG RY. 2012. Serum glucuronoxylomannan may be more appropriate for the diagnosis and therapeutic monitoring of *Trichosporon* fungemia than serum b-D-glucan. *Journal Infectious Diseases* 16: e638.
- LIN, M. Y et al. 2005.Prior antimicrobial therapy and risk for ospitalacquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. *Antimicrob Agents Chemother,* 49:.4555-60,

- LIU X. Z et al. 2015. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses *Studies in Mycology*. 81:1–26.
- LIU X. Z et al. 2015. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Studies in Mycology*. 81:85–147
- LIU, T.-B., PERLIN, D.S., XUE, C., 2012. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence* 3:173–181.
- LODDER, J. 1970. The Yeasts: a taxonomic study. :1-1385
- LOHSE, M.B. et al 2018. Development and regulation of single and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 16:1:19–311.
- LYMAN CA et al. 1995. Detection and quantitation of the glucuronoxylomannan-like polysaccharide antigen from clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigeli* and implications for pathogenicity. *Journal Clinical Microbiology*. 33:126–130.
- MAH TF, O'TOOLE GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiology*. 9(1):34-9.
- MALIK, I. A et al. 1998. randomized comparison of fluconazole with amphotericin B as empiric anti-fungal agents in cancer patients with prolonged fever and neutropenia. *The American Journal of Medicine* . 105: 478-83.
- MARSHALL, M.E. 1994. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *Journal Cancer Research clinical Oncology*. 120:S39–S42.
- MARTINEZ LR and CASADEVALL A. 2006. *Cryptococcus neoformans* Cells in Biofilms Are Less Susceptible than Planktonic Cells to Antimicrobial Molecules Produced by the Innate Immune System. *Infection And Immunity*. 78:6118–6123
- MARTINEZ LR and FRIES BC. 2010. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Current Fungal Infection Reports*. 1:4(4):266-275.
- MARTINEZ LR, CASADEVALL A. 2015. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology Spectrum*. 3(3):0006- 2014.
- MARTINEZ, L.R., GARCIA-RIVERA, J., CASADEVALL, A., 2001. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. *Journal Clinical Microbiology*. 39:3365–3367.
- MARTY FM et al. 2003. Disseminated trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*. *Journal Clinical Microbiology*. 41: 5317–5320

- MARVIN, L.F., M.A. ROBERTS, AND L.B. FAY. 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 337(1–2):11-21.
- MASCHMEYER, G AND GLASMACHER, A. 2005. Pharmacological properties and clinical efficacy of a recently licensed systemic antifungal, caspofungin. *Mycoses*. 48:227-34.
- MATHÉ L, VAN DIJCK P 2013. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetic* 59: 251-264.
- MATSUE K, et al. 2006 Breakthrough trichosporonosis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin. *Clinical Infectious Diseases*. 42:753–757.
- MAXWELL, A. 1993. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Molecular Microbiology*. 9: 681-686.
- MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. 2016. Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30: 103–124.
- MCMANUS EJ, BOZDECH MJ, JONES JM. 1985. Role of the latex agglutination test for cryptococcal antigen in diagnosing disseminated infections with *Trichosporon beigelii*. *Journal Infectious Diseases*. 151: 1167–1169.
- MELCHER GP et al. 1991. Demonstration of a cell wall antigen cross-reacting with cryptococcal polysaccharide in experimental disseminated trichosporonosis. *Journal Clinical Microbiology*. 29: 192–196.
- MELO AS et al 2011. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Medical Mycology*. 49(3):253-262.
- MENICHETTI, F. 2009. Anidulafungin, a new echinocandin: effectiveness and tolerability. *Drugs*. 69: 95-7.
- MICELI MH, DIAZ JA, LEE SA. 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infectious Diseases*; 11: 142–151.
- MIMICA, L. M. J. et al. 2009. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 45:17-23.
- MIRANDA, LN et al. 2012. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *BMJ Open*. p.1-6
- MOLINA, J.R., ROJAS, R., SERRANO, J., GÓMEZ, P. 2012. Invasive fungal diseases in children with hematological malignancies and stem cell transplant recipients. *Journal of Hematological Malignancies*. 2: 4.

- MONDELLI, A. L. et al. 2012. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases. Botucatu: Cevap-unesp*, v. 18, n. 3, p. 335-339.
- MORABITO, G. et al. 2010. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in vitro cell-free systems. *Biochimie*. 92:1101-1107.
- MORACE, G et al. 2005. Anidulafungin, a New Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrobiology Agents Chemother*. 49: 767-769.
- MORA-DUARTE J, et al. 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*. 347: 2020 -9.
- MORA-DUARTE, J et al. 2003. Caspofungin Invasive Candidiasis Study Group. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *The New England Journal of Medicine*; 347:2020-9.
- MORENO-LOAIZA, M and MORENO-LOAIZA, O. 2017. Características clínicas y epidemiológicas de la candidemia en pacientes de un hospital de tercer nivel del sur del Perú, 2011-2014. *Acta médica Peru*. 34:4
- MORETTI-BRANCHINI, M.L et al. 2001 *Trichosporon* species in bone marrow transplanted patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 39:161-164.
- MOSMANN T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. 2012. Medical Microbiology. 7th edition. Iowa: Elsevier Health Sciences.
- NAGAYOSHI Y, et al. 2017. Unexpected effects of azole transporter inhibitors on antifungal susceptibility in *Candida glabrata* and other pathogenic *Candida* species. *PLoS One*. 11;12(7):e0180990.
- NEGRI M, et al. 2010. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia* 169: 175-182.
- NETT, J.E.; CRAWFORD, K.; MARCHILLO, K.; ANDES, D.R. 2010. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54:3505-3508.
- NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. 2015. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol. Annual Review of Microbiology*. 69:71–92.
- NOGUCHI, M. et al. 1995. Effects of piroxicam and esculetin on the MDA-MB-231 human. Prostaglandins. *Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 53:325–329.

- NOLTE, F. S et al. 1997 Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:196-9.
- NOREEN M, ARSHAD M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunology Resvis.*;62(2):234–52. 2015.
- NOSEK J. et al. 2009. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Current Genetics.* 55:497-509
- NUCCI M et al. 2010. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases.* 51(5):561-70.
- NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. 2002. Risk factors for breakthrough candidemia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 21:209-11.
- NWEZE EI, GHANNOUM A, CHANDRA J, GHANNOUM MA, MUKHERJEE PK. 2012. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 67(1):149-153.
- OBAYASHI, T. et al. 1995. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet.* 345:17-20.
- ODDS FC, BROWN AJ, GOW NA. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiology.* 11(6):272-9.
- OJALA, T. et al 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology.* 73:299-305.
- OLIVEIRA V K et al. 2014. Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46:301-5.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L AND AL-OBAIDI, M. 2017. Invasive Fungal Infections in the Intensive Care Unit. *Infectious Disease Clinics of North America.* 31:475–487.
- PAIS P et al. 2016. Membrane Proteomics Analysis of the *Candida glabrata* Response to 5-Flucytosine: Unveiling the Role and Regulation of the Drug Efflux Transporters CgFlr1 and CgFlr2. *Frontiers in Microbiology.* 7:2045.
- PAM, V. K et al. 2012. Fluconazole susceptibility and ERG11 gene expression in vaginal *Candida* species isolated from Lagos Nigeria. *Journal of Molecular Epidemiology and Genetics.* 3:84-90.
- PAPPAS P G et al. 2016. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases.* 62:e1–50

- PAPPAS, IERODIAKONOU, G., V., FALAGAS, M. E. 2009. Lost in translation: differences in antimicrobial indication approval policies between the United States and Europe. *Clinical Therapeutics*. 31:1595-603.
- PAPPAS, P., LIONAKIS, M., ARENDRUP, M., OSTROSKY-ZEICHNER, L., KULLBERG, B.J. 2018. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 4: 18026.
- PAPPAS, P.G. 2012. Micafungin for candidiasis. *Mycoses*. 55:8–12.
- PASQUALOTTO, A. C. 2008. Amphotericin B: the higher the dose, the higher the toxicity. *Clinical infectious diseases*. 47:1110.
- PATEL, J.S., Saiman, L. 2010. Antibiotic resistance in neonatal intensive care unit pathogens: mechanisms, clinical impact, and prevention including antibiotic stewardship. *Clinical Perinatol*. 37:547–563.
- PEARCE, R.; GREENWAY, D.; PARKINSON, A. 1992. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: Effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 298:211-225.
- PERFECT JR et al. 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 50(3):291-322.
- PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. 2007. Nosocomial fungal infections: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*, 45:321–346.
- PFALLER, M. A et al. 2010. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Clinical Microbiology*. 48: 1366- 77.
- PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. 2006. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clinical Microbiology*. 19:435-47.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology*. 20:133-63.
- PIERCE, C G.et al 2015. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. *NPJ Biofilms Microbiomes-Nature*. 1:15012.
- PIERCE, CG et al. 2008. Simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature Protocol.*, 3: 1494-1500.

- PULCRANO G, ROSCETTO E, IULA VD, PANELLIS D, ROSSANO F, CATANIA MR. 2013. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2012 Nov;31(11):2919-28.
- PUTIGNANI L, CARSETTI R, SIGNORE F, MANCO M. 2010. Additional maternal and nonmaternal factors contribute to microbiota shaping in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(42):E159
- QUINDÓS, G et al. 2009. Actividad antifúngica *in vitro* de la micafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*. 26:35-41.
- RAJ, H.G. et al. 1998. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part II: Mechanism-based inhibition of rat liver microsomal-mediated aflatoxin B1-DNA binding by the candidate antimutagen 7,8-diacetoxy-4-methylcoumarin. *Bioorganic Medicinal & Chemistry*. 6:1895-1904.
- RAMAGE G et al. 2009. Our current understanding of fungal biofilms. *Critical Reviews in Microbiology* 35:340-355.
- RAMAGE G, et al 2002. *In vitro* pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46(11):3634-3636.
- RAMAGE, G.; BACHMANN, S.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; LOPEZ RIBOT, J. L. 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 4: 973–980.
- RANGEL-FRAUSTO et al. 1999. National epidemiology of mycoses survey (NEM IS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*. 28:253-258.
- REBOLI AC, et al. 2007. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*. 356:2472–82.
- RESENDE, J. C. P. et al. 2004. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. isolated from hospitalized patients. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21: 24-8.
- REVANKAR SG, et al. 1998. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the national committee for clinical laboratory standards. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:153-156.
- REX J.H et al. 2001. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 : 643-651.
- RICHARDSON, M.D AND LASS-FLÖRL, C. 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 14: 5-24

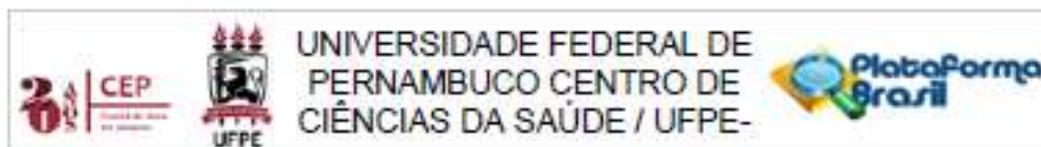
- ROBBINS, N., CAPLAN, T., and COWEN, L. E. 2017. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annual Review of Microbiology*. 71:753–75.
- RODRIGUES, W. B.; GUIMARÃES, T. A.; FONTENELE, A.M.M. 2017. Infecções fúngicas em transplantados renais: uma revisão integrativa. *Revista Pesquisa de Saúde*. 18(2): 119-123.
- RODRIGUEZ-TUDELA JL et al. 2005. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 4026–4034.
- ROJAS, F.M. AND MAGDALENA, G.G. 2004. *Hongos levaduriformes em neonatos. recuencia sensibilidad antifúngica. Comunicaciones científicas y tecnológicas*. Universidad National del Nordeste,
- ROSE, C.D., NEVEN, B., WOUTERS, C., 2014. Granulomatous inflammation: the overlap of immune deficiency and inflammation. *Best Practice & Research: Clinical Rheumatology*. 28, 191–212.
- RUAN SY, CHIEN JY, HSUEH PR.2009. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. *Clinical infectious diseases*.49:11–e17.
- RUZICKA, F., V. HOLA, M. VOTAVA, AND R. TEJKALOVA. 2007. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiology*. 52:209–214.
- SABATELLI, F et al. 2006. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* .50: 2009-15.
- SAENE, V.H.K., DAMJANOVIC, V., PIZER, B., PETROS, A.J. 2009. Fungal infections in ICU. *Infectious Disease Clinics of North America*. 41: 337-340.
- SANGUINETTI, M. et al. 2007. Evaluation of vitek 2 and rapid yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 45:1343-6.
- SARDARI, S.; MORI, Y.; HORITA, K.; MICETICH, R.G.; NISHIBE,S.; DANESHTALAB, M. 1999. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 7:1993-1940.
- SCHULZE, J., SONNENBORN, U. 2009. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Deutsches Ärzteblatt International*. 06(51-52): 837–842.
- SEIDLER M, SALVENMOSER S, MÜLLER FM. 2010. Liposomal amphotericin B eradicates *Candida albicans* biofilm in a continuous catheter flow model. *FEMS Yeast Research*.10(4):492-495.

- SENEVIRATNE CJ, JIN L, SAMARANAYAKE LP. 2008. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseases*. 14:582–90.
- SERENA C et al. 2006. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of invasive trichosporonosis. *Antimicrob Agents Chemother*.50: 2240–2243.
- SHIBUYA K et al. 2005. Granuloma and cryptococcosis. *Jornaul Infectious Chemotherapy* 11(3):115–22
- SHINOZAKI M et al. 2013. Development of a peptide nucleic acid probe to Trichosporon species and identification of trichosporonosis by use of in situ hybridization in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) sections. *Journal clinical microbiology*. 51: 295–298.
- SILVA RF 2010. Infecções fúngicas em imunocomprometidos. *Jornal Brasileiro Pneumologia* 36: 142-147.
- SILVA S et al. 2009. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology*. 47: 681-689.
- SILVA, C.M. et al. 2015. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia* 179: 1-5.
- SINGH, I.; KAUR, H.; KUMAR, S.; KUMAR, A.; LATA, S.; KUMAR, A. 2010. Synthesis of new coumarin derivatives as antibacterial agents. *International Journal of ChemTech Research*. 2:1745-1752.
- SNELDERS E. 2009. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Applides environmental Microbiology*. 75(12):4053-7
- SOLL, D.R. 2008. *Candida* biofilms: is adhesion sexy? *Current Biology*. 18:153-155.
- SONNEBORN A . et al. 2009. Chlamydospore Formation in *Candida albicans* Requires the Efg1p Morphogenetic Regulator. *American Society for Microbiology Journals*.
- STEIN, A.C et al 2006. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 107,:95-98.
- SUH J W, et al . 2020. Anidulafungina versus micafungina no tratamento de candidemia em pacientes adultos. *Mycopathologia*.185:653 – 664.
- SUTCU, M et al. 2016. Epidemiologic and microbiologic evaluation of nosocomial infections associated with *Candida* spp in children: A multicenter study from Istanbul, Turkey. *American Journal of Infection Control* 44:1139-43
- SUZUKI K et al. 2010. Fatal Trichosporon fungemia in patients with hematologic malignancies. *European Journal of Haematology*. 84: 441–447.
- TAFF HT, MITCHELL KF, EDWARD JA, ANDES DR 2013. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology* 8: 1325-1337.

- TAKEUCHI O, S. et al. 2002. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *Journal Immunology [Internet]*;169(1):10–4.
- TAMURA, N. K. et al. 2007. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40:91-3.
- TAPIA, C.; LEON, E.; PALAVECINO, E. 2003. Antifungal susceptibility of yeasts by Etest. Comparison of 3 media. *Revista médica de Chile*, 131:299-302.
- TELES, H.L. et al. 2006. Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea* an endophytic fungus associated with *Xylopiia aromatic*. *Phytochemistry*. 67:2686-2690.
- THATI, B et al. 2007. Mechanism of action of coumarin and silver(I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in Vitro*, 21:801-808.
- TORTORANO, A. M. et al. 1997. “Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy,” *Mycoses*, 40(7):297–302.
- TURAN, H AND DEMIRBILEK, M. 2018. Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agentes. *Revista Argentina de Microbiología*. 50(1): 62-69.
- UPPULURI P, PIERCE CG, LOPEZ-RIBOT JL 2009. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future Microbiology*. 4: 1235-1237.
- UPPULURI P, SRINIVASAN A, RAMASUBRAMANIAN A, LOPEZ-RIBOT JL.2011. Effects of fluconazole, amphotericin B, and caspofungin on *Candida albicans* biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 55(7):3591-3593
- VALENZA, G. et al. 2008. Evaluation of new colorimetric vitek 2 yeast identification cards by use of different source media. *Journal of Clinical Microbiology*. 46:3784-7.
- VALLE, T.; LÓPEZ, J.L.; HERNÁNDEZ, J.M.; CORCHETE, P. 1997. Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. *Plant Science*.125:97-101.
- VAN DER GEEST PJ, HUNFELD NG, LADAGE SE, GROENEVELD AB. 2016. Micafungin versus anidulafungin in critically ill patients with invasive candidiasis: a retrospective study. *BMC Infection Diseases*. 15;16:490.
- VÁZQUEZ-GONZÁLEZ D et al 2013. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. *Journal of the German Society of Dermatology*.11:5:381-394.
- VEEN,S.Q. , CIAAS, E. C. J.,. KUIIPER, ED J. 2010. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass

- Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. p. 900–907
- VILLANUEVA, A.; GOTUZZO, E.; ARATHOON, E.G.; NORIEGA, L.M.; KARTSONIS. N.A.; LUPINACCI, R.J, et al. A randomized double-blind study invasive aspergillosis. *International Journal Antimicrob Agents*. V. 27: p. 457-67. 2006.
- VIVEK, A.RUCHIKA, B. MOLLY, M. 2015. Comparison of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species in a tertiary care center, North India. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 58(4):475-8.
- WALL, G. et al. 2019. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 52:1-6.
- WALSH TJ et al. 1990. *Trichosporon beigelii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *Journal Clinical Microbiology* 28: 1616–1622.
- WYNNE SM et al. 2004. Invasive infection with *Trichosporon inkin* in 2 siblings with chronic granulomatous disease. *Journal Allergy Clinical Immunology*. 114: 1418–1424.
- XIAO M et al.2015. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3-year national surveillance. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 70: 802–810.
- XU J, VILGALYS R, MITCHELL TG. 2000. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Ecology*. 9:1471–1481.
- YAMAN G, AKYAR I, CAN S. 2012. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagnostic Microbiology Infection*. 73(1):65-7.
- YANG, D et al 2010. Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 74:1424-1430.
- ZAOUTIS, T. E et al. 2005. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric patients: a survey of 4 children's hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 52: 295-8.
- ZARAGOZA O et al. 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology* 68: 133–216.

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Leveduros sistêmicas: diagnóstico laboratorial e abordagens proteômicas com ênfase no controle de biofilme, análise ultraestrutural e alvos terapêuticos fungicos

Pesquisador: FRANZ DE ASSIS GRACIANO DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68134917.5.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.131.485

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Doutorado pertencente ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos – UFPE, do aluno FRANZ DE ASSIS GRACIANO DOS SANTOS, sob orientação da Profa. Dra. Rejane Pereira Neves. O projeto propõe um estudo epidemiológico do tipo exploratório e prospectivo que avaliará casos de candidíase sistêmicas em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva. Serão incluídos nesta pesquisa os pacientes que estiverem internados em UTI no período de Agosto de 2017 a Abril de 2019 e que possuam solicitação médica para diagnóstico micológico. As coletas serão realizadas em um total de 100 pacientes internados no Hospital das Clínicas de Pernambuco e Hospital Getúlio Vargas, na cidade do Recife-PE. O estudo pretende avaliar o potencial de virulência de leveduras de origem clínica, quanto ao perfil proteômico e aspectos ultraestruturais na formação e tratamento de biofilmes, utilizando amostras de biópsia, fluidos biológicos como sangue, líquido cefalorraquidiano, lavado brônquico-alveolar, secreção de feridas, entre outros. Os experimentos laboratoriais serão executados no Laboratório de Micologia Médica no Departamento de Micologia, Centro de Biociências (UFPE), no Hospital das Clínicas e Hospital Getúlio Vargas e no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE. O projeto apresenta viabilidade física e financeira, uma vez que apresenta excelente infraestrutura bem como verba aprovada por órgão de fomento. Quanto aos questionamentos éticos, os riscos no

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br