

Modelo experimental *in vitro* de piedra branca e avaliação do perfil de susceptibilidade de *Trichosporon* frente a derivados de tiofeno-tiosemicarbazona (L10)

Experimental model *in vitro* of white piedra and evaluation of the susceptibility profile of *Trichosporon* against thiophene-tiosemicarbazone derivatives (L10)

Modelo experimental *en vitro* de piedra branca y evaluación del perfil de sostenibilidad de *Trichosporon* frente de derivados de tiofeno-tiosemicarbazona (L10)

Recebido: 15/09/2021 | Revisado: 20/09/2021 | Aceito: 22/09/2021 | Publicado: 26/09/2021

Isabella Macário Ferro Cavalcanti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7889-3502>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: isabella.cavalcanti@ufpe.br

Jean Arthur Lima Falcão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0307-7479>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: jeanlf89@gmail.com

Ylanna Larissa Alves Ferreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3871-5194>
Centro Universitário São Miguel, Brasil
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: larissxalves@gmail.com

Cícero Pinheiro Inácio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5975-4382>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: cicero.inacio@ufpe.br

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5305-5545>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: daniellemacedo28@gmail.com

Cleide Clea Cunha Miranda

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: cccmiranda@hotmail.com

Rejane Pereira Neves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4184-7366>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: Rejane.neves@ufpe.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de patogenicidade *in vitro* e o perfil de susceptibilidade de isolados de *Trichosporon* spp. aos derivados de tiofeno-tiosemicarbazona (L10). Inicialmente, foi realizada uma revisão taxonômica de 3 isolados de *Trichosporon* spp. de importância clínica estocados na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Posteriormente foi avaliada a capacidade dessas espécies de crescer *in vitro* em amostras de pelos saudáveis (isentos de tratamentos químicos), a 25 °C e a 37 °C durante um período de 10 dias. Após este período, foi realizado exame direto dos pelos, utilizando KOH a 10%, e cultura em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol das amostras que cresceram no pelo, assim como análises da macro e micromorfologia dessas espécies fúngicas. Por fim, o perfil de susceptibilidade *in vitro* dessas espécies fúngicas aos derivados de tiofeno-tiosemicarbazona (L10) de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) foi realizado para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e as concentrações fungicidas mínimas (CFMs). Através do modelo experimental *in vitro* foi possível observar que as seguintes espécies: *Trichosporon asahii*, *T. ovoides* e *T. cutaneum* são agentes etiológicos da piedra branca e apresentam potencial patogênico mesmo em um modelo experimental *in vitro* e sem a necessidade de sinergismo com outros tipos de microrganismos. Através da análise do perfil de susceptibilidade *in vitro* foi possível observar que os novos derivados de tiofeno testados não são eficazes em combater o crescimento das espécies de *Trichosporon* avaliadas, sendo assim inadequados para o tratamento das manifestações clínicas observadas na piedra branca. Em conclusão, esse estudo mostrou que é possível cultivar *Trichosporon* em um modelo *in vitro* e que são necessárias buscas por outras abordagens terapêuticas eficazes para o combate de infecções causadas pelos fungos do gênero *Trichosporon*.

Palavras-chave: Micose; *Trichosporon* spp.; Patogenicidade; Atividade antibacteriana; Tiocompostos.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* pathogenicity potential and the susceptibility profile of *Trichosporon* spp. to thiophene-thiosemicarbazone derivatives (L10). At first, a taxonomic review of 3 *Trichosporon* spp. of clinical importance stored at the URM Micoteca of the Federal University of Pernambuco (UFPE). Posteriorly, the capacity of these species to grow *in vitro* in healthy hair (free from chemical treatments) at 25 °C and 37 °C for a period of 10 days was evaluated. After this period, direct examination of the hair was performed, using 10% KOH, and cultured in Sabouraud Agar medium with chloramphenicol of the samples that grew in the hair, as well as analyzes of the macro and micromorphology of these fungal species. Finally, the *in vitro* susceptibility profile of these fungal species to thiophene-thiosemicarbazone (L10) derivatives was performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) to determine minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal fungicidal concentrations (MFCs). Through the *in vitro* experimental model, it was possible to observe the following species: *Trichosporon asahii*, *T. ovoides* and *T. cutaneum* are etiological agents of white piedra and present pathogenic potential even in an *in vitro* experimental model without the need for synergism with other types of microorganisms. Through the analysis of the *in vitro* susceptibility profile, it was possible to observe that the new thiophene derivatives tested are not effective to inhibit the growth of the evaluated *Trichosporon* species, thus being inadequate for the treatment of clinical manifestations observed in white piedra. In conclusion, this study showed that it is possible to cultivate *Trichosporon* in an *in vitro* model and that searches for other effective therapeutic approaches are necessary to combat infections caused by fungi of the genus *Trichosporon*.

Keywords: Ringworm; *Trichosporon* spp.; Pathogenicity; Antibacterial activity; Thiocompounds.

Resumen

El objetivo del presente estudio para evaluar el potencial patogénico *in vitro* y el perfil de susceptibilidad de aislados de *Trichosporon* spp. a los derivados de tiofeno-tiosemicarbazona (L10). Inicialmente, una revisión taxonómica de 3 *Trichosporon* spp. de importancia clínica almacenados en la URM Micoteca de la Universidad Federal de Pernambuco (UFPE). Posteriormente, se evaluó la capacidad de estas especies para crecer *in vitro* en muestras de cabello sano (libre de tratamientos químicos) a 25 °C y 37 °C por un período de 10 días. Después de este período, se realizó un examen directo del cabello, utilizando KOH al 10%, y se cultivó en medio Agar Sabouraud con cloranfenicol de las muestras que crecieron en el cabello, así como análisis de la macro y micromorfología de estas especies de hongos. Finalmente, se realizó el perfil de susceptibilidad *in vitro* de estas especies fúngicas a derivados de tiofeno-tiosemicarbazona (L10) según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) y las concentraciones fungicidas mínimas (CFMs). A través del modelo experimental *in vitro* se pudo observar que las siguientes especies: *Trichosporon asahii*, *T. ovoides* y *T. cutaneum* son agentes etiológicos de la piedra blanca y tienen potencial patógeno incluso en un modelo experimental *in vitro* y sin necesidad de sinergismo con otros tipos de microorganismos. A través del análisis del perfil de susceptibilidad *in vitro*, se pudo observar que los nuevos derivados de tiofeno ensayados no son efectivos para combatir el crecimiento de las especies de *Trichosporon* evaluadas, por lo que resultan inadecuados para el tratamiento de las manifestaciones clínicas observadas en la piedra blanca. En conclusión, este estudio mostró que es posible cultivar *Trichosporon* en un modelo *in vitro* y que es necesario buscar otros enfoques terapéuticos efectivos para combatir las infecciones causadas por hongos del género *Trichosporon*.

Palabras clave: Tiña; *Trichosporon* spp.; Patogenicidad; Actividad antibacteriana; Susceptibilidad.

1. Introdução

Os fungos pertencentes ao gênero *Trichosporon* são caracterizados fenotipicamente como basidiomicéticas que, se assemelham a organismos anamórficos distribuídos extensivamente na natureza, sendo encontradas em vários substratos como solo, madeira, ar, água, queijo, fezes de pássaros e outras fontes, principalmente em regiões tropicais (Jannic *et al.*, 2018; Francisco *et al.*, 2019). Estes patógenos fúngicos são representados por estruturas de reprodução assexuada que se baseiam na diferenciação morfológicas em blastoconídios, micélios verdadeiros e artroconídios (Robles-Tenório *et al.*, 2020). A identificação de estruturas morfológicas patogênicas, como blastoconídios, são amplamente relatadas na prática clínica, uma vez que, infecções fúngicas superficiais e invasivas tem aumentado gradativamente, especialmente, em pacientes imunossuprimidos (Liao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020).

Estas leveduras estão ocasionalmente presentes no trato gastrointestinal e na microbiota da cavidade oral de humanos, podendo colonizar transitoriamente o trato respiratório e a pele (Cafarchia *et al.*, 2008; Fuentesfria *et al.*, 2008; Taverna *et al.*, 2014; Francisco *et al.*, 2019). O gênero foi descrito em 1865 e as espécies foram nomeadas como *Trichosporon beigelii*,

entretanto, anos após a sua identificação, mais de 50 espécies foram classificadas, onde *T. inkin*, *T. cutaneum* e *T. ovoides* constituem os organismos mais abundantes conhecidos por causar infecções superficiais (Francisco *et al.*, 2019; Robles-Tenório *et al.*, 2020). Embora estes microrganismos sejam reconhecidos como espécies pertencentes a microbiota humana, pacientes com câncer, neutropênicos ou em estado crítico recebendo antibióticos ou corticosteroides, ou submetidos a procedimentos médicos invasivos são comumente descritos como alvos destas infecções fúngicas superficiais (Arendrup *et al.*, 2014; Jannic *et al.*, 2018).

A piedra branca é uma micose causada pelos fungos do gênero *Trichosporon*. Essa micose superficial é caracterizada por nódulos branco-amarelados nos pelos genitais, bigode, barba, axilas e no couro cabeludo. Entretanto, este patógeno pode ser considerado um fungo oportunista uma vez que é capaz de causar infecções cutâneas, profundas e disseminadas principalmente em pacientes imunossuprimidos (Francisco *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). A patogenicidade de fungos pertencentes ao gênero *Trichosporon* pode ser identificada a partir de modelos *in vitro*, que por sua vez, são capazes de identificar a presença de fungos patogênicos através da reprodução de suas estruturas morfológicas (blastoconídios, hifas, arthroconídios) (Li *et al.*, 2020; Martínez-Herrera *et al.*, 2021). Além disso, através dos modelos *in vitro* é possível definir a suscetibilidade deste patógenos fúngicos à compostos sintéticos e semi-sintéticos (Jesus, 2018).

As opções terapêuticas para os casos sistêmicos incluem o fluconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol e anfotericina (Robles-Tenório *et al.*, 2020). Porém muitas vezes o tratamento das infecções causadas por *Trichosporon* spp. implica em controvérsias e os efeitos da terapêutica ainda são ineficazes. Assim, a comunidade científica tem reunido esforços para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, como por exemplo, compostos sintéticos ou semi-sintéticos, especialmente os análogos ou aqueles que são oriundos de metabólitos secundários isolados de plantas. Neste sentido, os tiofenos poderiam surgir como uma alternativa terapêutica.

Os tiofenos e seus derivados são compostos heterocíclicos aromáticos caracterizados por uma variedade de propriedades biológicas, como atividade antibacteriana, antitumoral, analgésica, antiinflamatória, antioxidante e, em especial, antifúngica (Oliveira, 2011; Mohammad *et al.*, 2012). Entre seus derivados, as tiossemicarbazonas destaca-se devido a ampla versatilidade química e aplicações biológicas e farmacoterapêuticas promissoras (Bharti *et al.*, 2010; Almeida Júnior., 2017) Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de patogenicidade *in vitro* e o perfil de susceptibilidade de isolados de *Trichosporon* spp. aos derivados de tiofeno-tiossemicarbazona (L10).

2. Metodologia

Condição de crescimento dos isolados

Este é um estudo do tipo experimental, onde foram utilizadas 3 cepas de *Trichosporon* obtidas na Culture Collection URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (www.ufpe.br/micoteca). Os isolados foram conservados em óleo mineral (Sherf, 1943) e reativados em caldo de glicose, sendo mantidos a 30 °C por 48 horas. Em seguida, foram semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Dextrose Sabouraud (ADS, Difco) (Estrela, 2018).

Identificação convencional

Os aspectos morfológicos e fisiológicos do *Trichosporon* foram registrados de acordo com Barnett *et al.* (2000). Os isolados foram colocados em SDS (difco) e incubados a 28 °C e 37 °C durante 3 a 7 dias. Após a incubação, os isolados foram avaliados em microscópio e fotografados. As suspensões de células da levedura foram prepares em 9 L de caldo de extrato de levedura (0,5 McFarland). Em seguida, 3 mL da suspensão foram colocados em meio ágar C e N, aquecidos a 45 a 50 °C. Fontes de carbono e nitrogênio foram adicionadas separadamente à superfície do meio solidificado. Posteriormente, as placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por 72 horas, sendo avaliadas quanto a formação de halo.

Modelo de infecção por *Trichosporon* spp.

O couro cabeludo usado no experimento não tinha história prévia de tratamento capilares e estava em boas condições. Os cabelos foram pesados em 0,05 g e cortados com até 1 cm de comprimento. Em seguida, os cabelos foram colocados em placas de Petri e esterilizados na autoclave. Para o modelo experimental, 0,5 mL de suspensão de células de *Trichosporon* spp., de 10^3 e 10^6 células/mL, foram adicionados em placas de Petri com os fios de cabelo e incubadas a 37 ± 2 °C por 30 dias. O processo de infecção foi avaliado por microscopia em lâminas de vidro contendo os fios de 40 µL de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 20%. Simultaneamente, porções dos cabelos infectados foram semeadas em meio de cultura DAS (Difco) (Retocultura) e incubadas por 7 dias a 28 ± 2 °C.

Atividade antifúngica *in vitro*

Os testes de sensibilidade foram realizados com os três isolados e seguiram o método da microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada no documento M27-A3 pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado foi RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) com L-glutamina, 2,0 g/L de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) a concentração final de 0,165 mol/L e pH 7,0. A concentração final do inóculo das leveduras foi de $1,5 \pm 1,0 \times 10^3$ UFC/mL. Os fármacos testados foram o itraconazol em concentrações que variaram entre 0,03 a 16 µg/mL e derivados tiofenos em concentrações que variaram entre 1 a 512 µg/mL.

Após a distribuição do meio RPMI-1640, dos fármacos e do inóculo, as placas de microdiluição foram incubadas a 37 °C por 48h. Posteriormente, foi realizada a leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM) que corresponde à menor concentração capaz de impedir o crescimento visível dos isolados testados (PFALLER *et al.*, 2004). As suspensões fúngicas que exibiram diminuição expressiva foram cultivadas em meio Ágar Sabouraud com extrato de levedura a fim de determinar a ação fungicida dos antifúngicos testados. O controle de qualidade foi realizado testando linhagens recomendadas pelo CLSI, como por exemplo, *C. krusei* 6528 e *C. parapsilosis* 22019 (CLSI, 2008).

3. Resultados e discussão

Revisão taxonômica dos isolados de *Trichosporon* spp.

Neste estudo foram identificados *Trichosporon asahii* (URM 6290), *T. ovoides* (URM 6294) e *T. cutaneum* (URM 6296) através das características taxonômicas observadas na Tabela 1. Todos os aspectos avaliados neste estudo estão embasados nas características que já foram descritas na literatura (Barnett *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005, Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2008).

Tabela 1. Características morfológicas e fisiológicas do *Trichosporon asahii* (URM 6290), *T. ovoides* (URM 6294) e *T. cutaneum* (URM 6296).

Amostras	Revisão taxonômica das amostras		
	Aspectos Macroscópicos	Aspectos microscópicos	Assimilação de carboidratos
<i>Trichosporon asahii</i>	Colônias brancas e centro com aspecto farináceo.	Artroconídeos abundantes e retangulares.	Assimilação de ramnose, galactose e ausência de assimilação de inositol.
<i>T. ovoides</i>	Colônias secas com aspecto farináceo, com profundas fissuras radiais e coloração creme.	Blastoconídeos, hifas septadas e artroconídeos.	Assimilação de ramnose e ausência de assimilação de L-arabinitol.
<i>T. cutaneum</i>	Colônias de coloração creme e cerebriformes, que não se tornam farináceas com o tempo e presença de fissura na zona marginal.	Hifas hialinas septadas, artroconídeos regulares e presença de blastoconídeos.	Assimilação de glicose, sacarose, maltose e lactose.

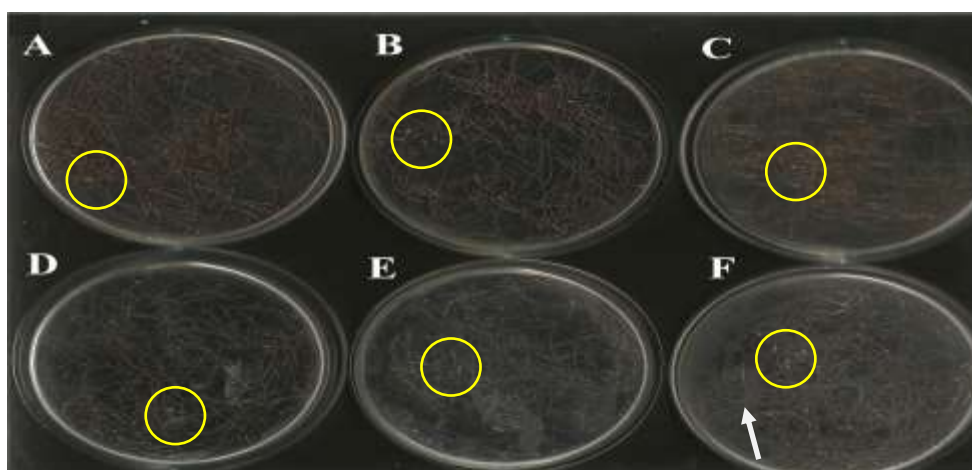
Fonte: Autores.

Determinação do potencial patogênico de *Trichosporon* spp. no modelo experimental *in vitro*

A determinação do potencial patogênico de *Trichosporon* spp. no modelo experimental *in vitro* foi realizada através da metodologia de Macêdo e colaboradores (2005). Os fragmentos capilares expostos as suspensões fúngicas mantidos a 25 °C e incubados a 37 °C foram analisados por 10 dias a fim de se observar os nódulos esbranquiçados, característicos das manifestações clínicas da piedra branca. Inicialmente, os controles negativos foram separados, cuja ausência de manifestações clínicas foi observada durante todo o experimento.

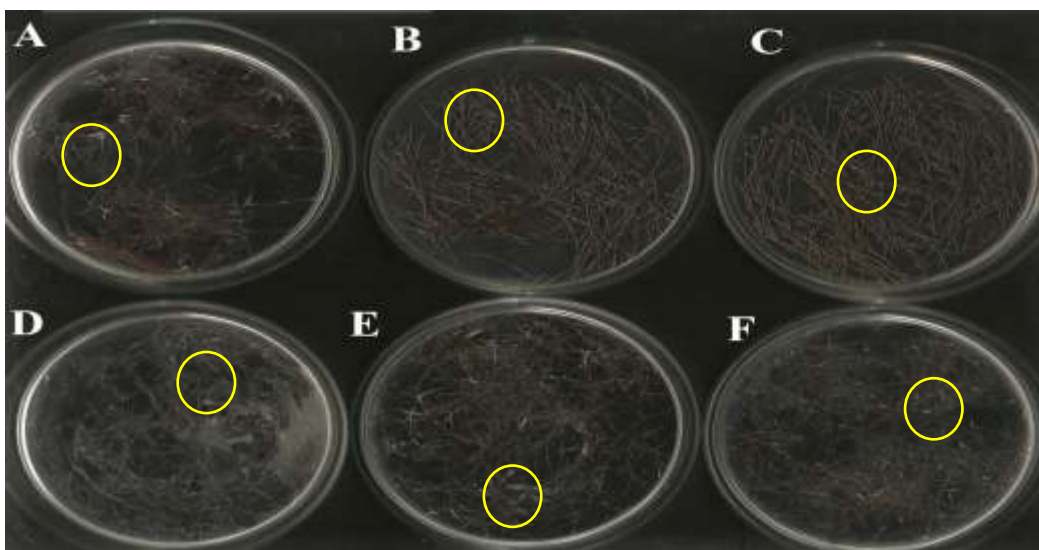
Após três dias de exposição dos pelos aos inóculos foi possível observar as primeiras manifestações da piedra branca, que não sofreram alterações significativas até o fim do experimento, conforme mostram as figuras 1, 2 e 3. Este resultado indica que mesmo uma espécie que tem sido relacionada com micoses sistêmicas e disseminadas, como por exemplo, o *T. asahii* (Moretti-Branchini *et al.*, 2001; Shang *et al.*, 2010), apresentou capacidade em formar nódulos da piedra branca *in vitro*.

Figura 1. Modelo experimental *in vitro* de piedra branca evidenciando nódulos característicos em pelos expostos a *Trichosporon asahii* (URM 6290) (triplicata). A, B e C apresentavam temperatura de incubação de 25 °C e D, E e F apresentaram temperatura de incubação de 37 °C.



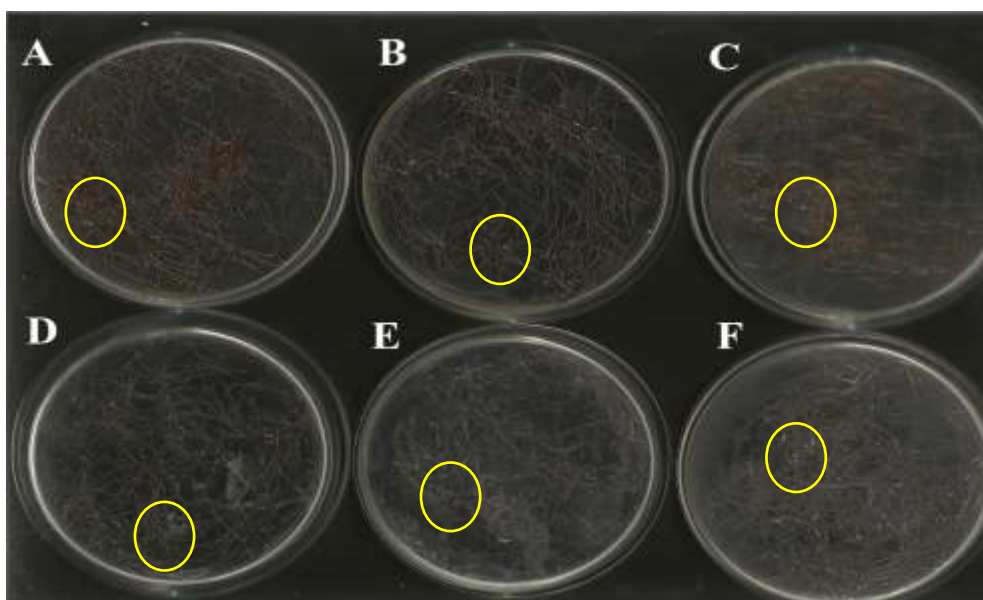
Fonte: Autores.

Figura 2. Modelo experimental *in vitro* de pedra branca evidenciando nódulos característicos em pelos expostos a *Trichosporon ovoides* (URM 6294) (triplicata). A, B e C apresentavam temperatura de incubação de 25 °C e D, E e F apresentavam temperatura de incubação de 37 °C.



Fonte: Autores.

Figura 3. Modelo experimental *in vitro* de pedra branca evidenciando nódulos característicos em pelos expostos a *Trichosporon cutaneum* (URM 6296) (triplicata). A, B e C apresentavam temperatura de incubação de 25 °C e D, E e F apresentavam temperatura de incubação de 37 °C.



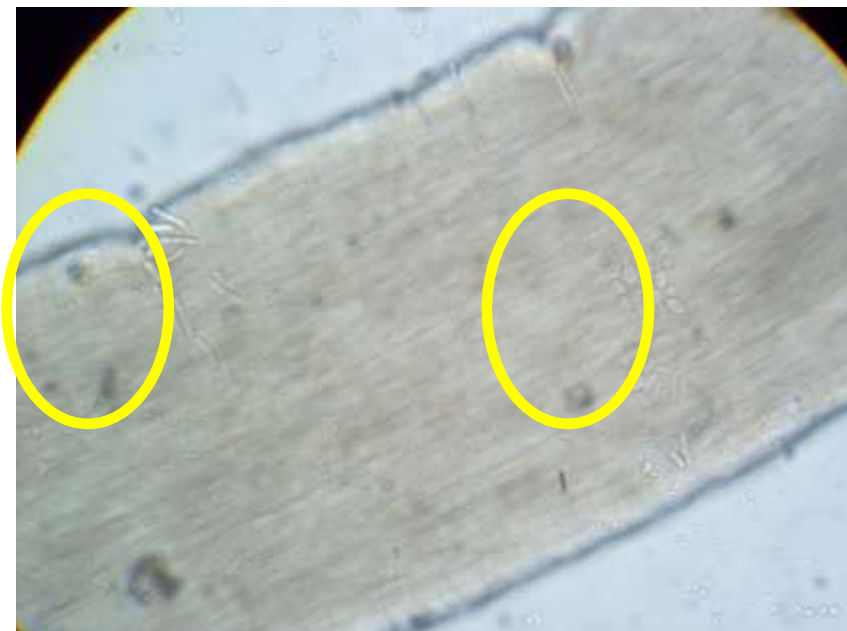
Fonte: Autores.

É possível identificar a formação dos nódulos esbranquiçados nos pelos (círculos), característicos da infecção por pedra branca, observando maior proliferação das manifestações nas amostras incubadas a 37 °C.

Após observação macroscópica do desenvolvimento das manifestações clínicas, buscou-se identificar a formação dos nódulos a nível microscópico. A partir das lâminas com o pelo foi possível verificar estruturas em parasitismo, como por exemplo, artroconídeos e blastoconídeos (Figura 4 e Figura 5). Os fungos são patógenos constituídos por diversos fatores que

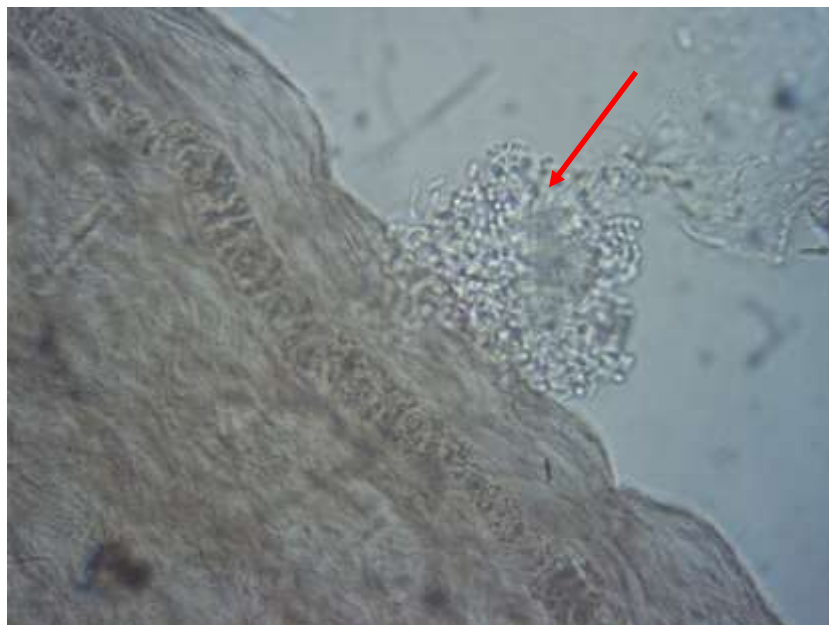
influenciam na sua disseminação no interior do hospedeiro, sendo eles, mudança morfológica, capacidade de aderir a superfícies abióticas, termo tolerância, expressão de componentes da parede celular e produção e secreção de enzimas (Colombo *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2018). Já é descrito na literatura que os artroconídios e blastoconídios são alguns dos principais precursores da patogenicidade em espécies do gênero *Trichosporon*, uma vez que, esta estrutura possuem a capacidade de realizar transformações morfológicas para a forma filamentosa. Além disso, já foi observada a presença de blastoconídios e artroconídios em biofilmes fúngicos. Biofilmes são matriz extracelular polimérica auto produtivas formando comunidades microbiológicas que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas (Cordeiro *et al.*, 2019). Fungos que vivem em biofilmes são mais resistentes a condições de estresse ambiental e aos antifúngicos. Assim, essa forma de vida microbiana é considerada um fator de virulência fazendo com que fungos que vivem em biofilme sejam mais patogênicos comparados aos fungos que vivem de forma planctônica. (Iturrieta-González *et al.*, 2014; De Aguiar Cordeiro *et al.*, 2015).

Figura 4. Artroconídeos e blastoconídeos em destaque, iniciando a formação do nódulo no pelo exposto ao *Trichosporon ovoides* (100 ×).



Fonte: Autores.

Figura 5. Formação do nódulo característico da piedra branca no pelo exposto ao *Trichosporon ovoides* (400 ×).



Fonte: Autores.

Após a identificação macro e microscópica da formação dos nódulos, realizou-se o retrocultivo e observou-se o desenvolvimento das culturas de *Trichosporon asahii*, *T. cutaneum* e *T. ovoides* (Figura 6) com aspectos que confirmaram tratar-se das amostras utilizadas em todo o experimento.

Após o modelo experimental e avaliação microscópica evidenciando parasitismo nos pelos por *Trichosporon* spp. foi possível observar que este gênero apresenta um poder patogênico *in vitro*, isto é, formação de nódulos, sem a necessidade de sinergismo com bactérias.

Figura 6. Retrocultivo de *Trichosporon* spp. em ágar Sabouraud incubado por dez dias a 37°C.



Fonte: Autores.

Testes de susceptibilidade *in vitro*

Quanto aos testes de suscetibilidade *in vitro*, o itraconazol apresentou CIM e CFM de 0,25 µg/mL frente aos três isolados de *Trichosporon* spp. (Tabela 2), apresentando assim efeito fungistático e fungicida. Estes resultados estão de acordo com a literatura uma vez que Rodriguez-Tudela e colaboradores (2005) encontraram CIMs de itraconazol de 0,57 µg/mL, 0,42 µg/mL e 0,24 µg/mL frente a *Trichosporon asahii*, *Trichosporon cutaneum* e *Trichosporon ovoides*, respectivamente, assim como Paphitou e colaboradores (2002) encontraram CIM de 0,25 µg/mL para diversas espécies de *Trichosporon*.

Os derivados do tiofeno apresentaram CIMs acima de 512 µg/mL (Tabela 3), resultados estes muito superiores quando comparados aos fármacos preconizados para terapêutica clínica desta micose, sendo, desta forma, os tiofenos inapropriados ao tratamento das manifestações clínicas observadas no quadro da piedra branca. Uma vez que os derivados tiofenos testados neste trabalho não apresentaram atividade antifúngica frente ao *Trichosporon* spp., evidenciamos mais uma vez que o número de novos fármacos eficazes para o tratamento das doenças associadas a estes patógenos não acompanha o número de patologias e óbitos provocados por este fungo (Li *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020).

Os índices de casos de infecções invasivas causadas por patógenos fúngicos, em especial, o *Trichosporon*, tem aumentado consideravelmente devido a limitação da sensibilidade a diversas classes de antifúngicos, assim como a ausência de novos fármacos eficazes (Iturrieta-González *et al.*, 2014; Padovan *et al.*, 2019; Kuo *et al.*, 2020). Atualmente, os polienos, azóis e triazóis são classificados como principais classes de antifúngicos, em especial, a Anfotericina B (polieno), Voriconazol (azol) e Fluconazol (azol), que se destacam como fármacos de primeira escolha para o tratamento destes patógenos fúngicos (Padovan *et al.*, 2019; El Attar *et al.*, 2020).

Entretanto, em 2005, um estudo realizado por Rodriguez-Tudela evidenciou que, são necessárias maiores concentrações de Anfotericina B (≥ 2 µg/mL) para inibição do *T. asahii* quando comparado ao Voriconazol (<0,14 µg/mL). Outro estudo, realizado por Iturrieta-González *et al.* (2014) confirmou o Voriconazol como melhor opção de tratamento por infecções causadas pelo patógeno *T. asahii* comparado ao Fluconazol.

Tabela 2. Atividade antifúngica do itraconazol e dos derivados do tiofeno frente a *Trichosporon asahii* (URM 6290), *T. ovoides* (URM 6294) e *T. cutaneum* (URM 6296).

Amostras	CIM (µg/mL)			
	Tiofeno 1	Tiofeno 2	Tiofeno 3	Itraconazol
<i>T. asahii</i>	> 512	> 512	> 512	0,25
<i>T. ovoides</i>	> 512	> 512	> 512	0,25
<i>T. cutaneum</i>	> 512	> 512	> 512	0,25

CIM: Concentração Inibitória Mínima. Fonte: Autores.

Neste contexto, uma possível alternativa para ultrapassar a resistência e a alta mortalidade relacionada a doenças severas causadas por *Trichosporon* spp. seria a combinação de duas ou três classes de antifúngicos, especialmente se estes medicamentos apresentarem mecanismos de ação diferentes (Cawley *et al.*, 2000; Moretti-Branchini *et al.*, 2001; Mooty *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005; El Attar *et al.*, 2020; Lan *et al.*, 2020).

Em 2020, El Attar *et al.* relataram o uso de um antifúngico tópico sozinho e combinado com dois antifúngicos orais no tratamento da piedra branca. O estudo foi realizado em três grupos contendo vinte pacientes em cada. O primeiro grupo (A), recebeu clotrimazol tópico, o segundo (B), recebeu clotrimazol tópico combinado com itraconazol oral e o terceiro grupo (C), recebeu clotrimazol tópico combinado com terbinafina oral. Ao final do estudo, todos os pacientes obtiveram eliminação

completa da infecção. Entretanto, o tempo médio de tratamento no grupo B foi significativamente menor que no grupo A e C (Lan *et al.*, 2020). Assim, ao longo dos anos, diversos estudos têm demonstrado o aumento da resposta terapêutica no tratamento de uso combinado de fármaco em casos de resistência (Rizzitelli *et al.*, 2016).

Em contrapartida, apesar da eficácia da combinação de fármacos, a resistência aos medicamentos e a virulência relacionada a produção de biofilmes permanecem sendo preocupações para a comunidade médica e científica (Lan *et al.*, 2020). Desta maneira, outras terapias têm surgido como uma alternativa para o tratamento das infecções causadas pelo *Trichosporon*.

Lan e colaboradores (2020), exploraram a combinação de terapia fotodinâmica (PDT) com o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e Itraconazol para a melhora da eficácia do antifúngico *in vitro* e *in vivo*. Na clínica, a terapia resultou na eficácia no tratamento de um paciente com infecção grave causada por *T. asahii*; enquanto os resultados *in vitro*, demonstraram o aumento da sensibilidade das células planctônicas e do biofilme após o uso do ALA-PDT combinado com Itraconazol, sugerindo um tratamento promissor contra a resistência antifúngica e produção de biofilmes (Lan *et al.*, 2020).

Embora outros estudos com o uso de PDT contra patógenos fúngicos, como a *Candida* (Junqueira *et al.*, 2012; Azizi *et al.*, 2016), já são encontrados na literatura, evidenciando a eficiência desta terapia, ainda é necessário um maior conhecimento clínico desta metodologia e outras abordagens terapêuticas promissoras.

4. Conclusão

No presente estudo, foi realizada uma revisão taxonômica de três isolados de *Trichosporoni* spp., de importância clínica estocados na Micoteca URM, evidenciando as espécies *Trichosporon asahii*, *T. Ovoide* e *T. Cutaneum*. As análises foram realizadas através de um modelo experimental *in vitro* onde foi possível observar as seguintes espécies como agentes patogênicos da pedra branca e seu potencial patogênico. Pode-se observar que as espécies do gênero *Trichosporon* desenvolveram-se mais rapidamente a 37°C do que a 25°C e a espécie *Trichosporon ovoides* apresentou um crescimento mais expressivo entre os três isolados avaliados. Além disso, o presente estudo constatou que não há necessidade de um sinergismo para o desenvolvimento das manifestações clínicas da *pedra* branca.

Os derivados de tiofeno testados mostraram-se ineficazes no combate do crescimento das espécies de *Trichosporon* avaliadas, sendo assim, inadequados para o tratamento das manifestações observadas nos quadros de *pedra* branca. Neste contexto, considerando a crescente no número de casos clínicos e implicações causadas por espécies de *Trichosporon* em simultaneidade com limitação de tratamentos eficazes, torna-se imprescindível a busca por abordagens terapêuticas exitosas para o combate de infecções causadas pelos fungos do gênero *Trichosporon*.

Por fim, esta pesquisa abre o leque para pesquisas relacionadas a outras espécies de *Trichosporon*, até então não descritas como agentes etiológicos de *pedra* branca. Além disso, é fundamental a utilização de novos compostos a fim de melhorar o arsenal terapêutico para o tratamento desta importante condição.

Referências

- Almeida Jr., A. S. A. D. (2017). Avaliação da atividade esquistossomicida e análise ultraestrutural de derivados indol-tiossemicarbazonas. Atena Repositório Digital. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/32439>.
- Arendrup, M. C., Boekhout, T., Akova, M., Meis, J. F., Cornely, O. A., Lortholary, O., & ESCMID EFISG study group and ECMM. (2014). ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 76-98.
- Azizi, A., Amirzadeh, Z., Rezai, M., Lawaf, S., & Rahimi, A. (2016). Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 158, 267-273.
- Barnett, J. A. (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification*, (3a ed.), Cambridge University Press: 1139.
- Bharti, S. K., Nath, G., Tilak, R., & Singh, S. K. (2010). Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2, 4-disubstituted thiazole ring. *European journal of medicinal chemistry*, 45(2), 651-660.

- Carvalho, A. M. R. D., Melo, L. R. B. D., Moraes, V. L., & Neves, R. P. (2008). Invasive *Trichosporon cutaneum* infection in an infant with wilms' tumor. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 59-60.
- Cawley, M. J., Braxton, G. R., Haith Jr, L. R., Reilly, K. J., Guilday, R. E., & Patton, M. L. (2000). *Trichosporon beigelii* infection: experience in a regional burn center. *Burns*, 26(5), 483-486.
- Cordeiro, R. D. A., Pereira, L. M. G., de Sousa, J. K., Serpa, R., Andrade, A. R. C., Portela, F. V. M., & Rocha, M. F. G. (2019). Farnesol inhibits planktonic cells and antifungal-tolerant biofilms of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin*. *Medical mycology*, 57(8), 1038-1045.
- Colombo, A. L., Padovan, A. C. B., & Chaves, G. M. (2011). Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 682-700.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Edition M27-A3, CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
- De Aguiar Cordeiro, R., et al. (2015). *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. *Journal of medical microbiology*, 64(11), 1277-1286.
- El Attar, Y., Atef Shams Eldeen, M., Wahid, R. M., & Alakad, R. (2020). Efficacy of topical vs combined oral and topical antifungals in white piedra of the scalp. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 00, 1-6.
- Estrela, C. (2018). Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa. Editora Artes Médicas.
- Francisco, E. C., de Almeida Junior, J. N., de Queiroz Telles, F., Aquino, V. R., Mendes, A. V. A., de Andrade Barberino, M. G. M., & Colombo, A. L. (2019). Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 909-e1.
- Iturrieta-González, I. A., Padovan, A. C. B., Bizerra, F. C., Hahn, R. C., & Colombo, A. L. (2014). Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PLoS One*, 9(10), e109553.
- Jannic, A., et al. (2018). *Trichosporon inkin* causing invasive infection with multiple skin abscesses in a renal transplant patient successfully treated with voriconazole. *JAAD case reports*, 4(1), 27.
- Jesus, S, D. F. F. D. (2018). Caracterização molecular e análise da expressão gênica de adesivas na levedura emergente *Trichosporon asahii*. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações. <https://bddd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1435>.
- Junqueira, J. C., et al. (2012). Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2, 9, 16, 23-tetrakis (phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). *Lasers in medical science*, 27(6), 1205-1212.
- Kuo, S. H., Lu, P. L., Chen, Y. C., Ho, M. W., Lee, C. H., Chou, C. H., & Lin, S. Y. (2020). The epidemiology, genotypes, antifungal susceptibility of *Trichosporon* species, and the impact of voriconazole on *Trichosporon* fungemia patients. *Journal of the Formosan Medical Association*. 120(9):1686-1694
- Lan, Y., Lu, S., Zheng, B., Tang, Z., Li, J., & Zhang, J. (2020). Combinatory Effect of ALA-PDT and Itraconazole Treatment for *Trichosporon asahii*. *Lasers in Surgery and Medicine*. 53(5):722-730
- Li, H. M., Du, H. T., Liu, W., Wan, Z., & Li, R. Y. (2005). Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon* species. *Mycopathologia*, 160(3), 217-225.
- Li, H., Guo, M., Wang, C., Li, Y., Fernandez, A. M., Ferraro, T. N., ... & Chen, Y. (2020). Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past 23 years. *Epidemiology & Infection*, 148: e169.
- Liao, Y., Lu, X., Yang, S., Luo, Y., Chen, Q., & Yang, R. (2015, December). Epidemiology and outcome of *Trichosporon* fungemia: a review of 185 reported cases from 1975 to 2014. *Open forum infectious diseases* 2(4), 141.
- Macêdo, D. P. C., Neves, R. P., Magalhães, O. M. C., Souza-Motta, C. M. D., & Queiroz, L. A. D. (2005). Pathogenic aspects of Epidermophyton *floccosum* langeron et milochevitch as possible aethiological agent of Tinea capitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(1), 36-37.
- Martínez-Herrera, E., Duarte-Escalante, E., del Rocío Reyes-Montes, M., Arenas, R., Acosta-Altamirano, G., Moreno-Coutiño, G., & Frías-De-León, M. G. (2021). Molecular identification of yeasts from the order Trichosporonales causing superficial infections. *Revista Iberoamericana de Micología*. 38(3):119-124.
- Moretti-Branchini, M. L., Fukushima, K., Schreiber, A. Z., Nishimura, K., Papaiordanou, P. M., Trabasso, P., & Miyaji, M. (2001). *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 39(3), 161-164.
- Mooty, M. Y., Kanj, S. S., Obeid, M. Y., Hassan, G. Y., & Araj, G. F. (2001). A case of *Trichosporon beigelii* endocarditis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(2), 139.
- Padovan, A. C. B., Almeida, L. A. D., Gouveia, V. A., & Dias, A. L. T. (2019). Análise da localização, da expressão gênica e predição estrutural de adesinas hipotéticas no patógeno emergente *Trichosporon asahii*. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações. <http://bddd.unifal-mg.edu.br:8080/handle/tede/1598>.
- Paphitou, N. I., Ostrosky-Zeichner, L., Paetznick, V. L., Rodriguez, J. R., Chen, E., & Rex, J. H. (2002). In vitro antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(4), 1144-1146.
- Pereira, L. M. G. (2018). Atividade inibitória da molécula de Quorum Sensing Farnesol frente à cepas de *Trichosporon asahii* e *T. inkin*. Repositório institucional da UFC. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/35153>.

Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of clinical microbiology*, 42(10), 4419-4431.

Rizzitelli, G., Guanziroli, E., Moschin, A., Sangalli, R., & Veraldi, S. (2016). Onychomycosis caused by *Trichosporon mucoides*. *International Journal of Infectious Diseases*, 42, 61-63.

Robles-Tenório, A., Lepe-Moreno, K. Y., & Mayorga-Rodríguez, J. (2020). White piedra, a rare superficial mycosis: an update. *Current Fungal Infection Reports*, 14(3), 197-202.

Rodriguez-Tudela, J. L., Diaz-Guerra, T. M., Mellado, E., Cano, V., Tapia, C., Perkins, A., & Cuenca-Estrella, M. (2005). Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10), 4026-4034.

Shang, S. T., Yang, Y. S., & Peng, M. Y. (2010). Nosocomial *Trichosporon asahii* fungemia in a patient with secondary hemochromatosis: a rare case report. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43(1), 77-80.

Sherf, A.F. (1943). The method for maintaining *Phytomonas sepedomica* for long periods without transf. *Phytopathology*, 31 (3), 30-32.

Taverna, C. G., Cordoba, S., Murisengo, O. A., Vivot, W., Davel, G., & Bosco-Borgeat, M. E. (2014). Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. *Sabouraudia*, 52(4), 356-366.