

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ISABELE CARRILHO JARROS

CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO SOBRE MATRIZ DÉRMICA ACELULAR
POR *Candida* spp. E *Rhodotorula* sp. ISOLADAS DE PELE

Maringá

2016

ISABELE CARRILHO JARROS

CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO SOBRE MATRIZ DÉRMICA ACELULAR
POR *Candida* spp. E *Rhodotorula* sp. ISOLADAS DE PELE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof.a. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Maringá

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

J37c Jarros, Isabele Carrilho
Capacidade de migração sobre matriz dérmica acelular por *Candida* spp. e *Rhodotorula* sp. isoladas de pele / Isabele Carrilho Jarros. -- Maringá, 2016.
49 f. : il. (uma color.), figs., tab.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Melyssa Fernanda Norman Negri.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

1. *Candida* spp. - Colonização da pele. 2. *Rhodotorula* sp. - Colonização da pele. 3. Matriz dérmica acelular - Migração. 4. Acellular Dermal Matrix. I. Svidzinski, Terezinha Inez Estivalet, orient. II. Negri, Melyssa Fernanda Norman, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 21.ed. 616.969

AMMA-003362

FOLHA DE APROVAÇÃO
ISABELE CARRILHO JARROS

CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO SOBRE MATRIZ DÉRMICA ACELULAR
POR *Candida* spp. E *Rhodotorula* sp. ISOLADAS DE PELE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá (Presidente
da banca)

Prof^a. Dr^a Daiane Pereira Camacho
UNINGÁ – Centro Universitário Ingá

Prof^a. Dr^a Érika Seki Kioshima Cotica
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 19 de setembro de 2016

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos
aqueles que contribuíram para
sua realização.

EPÍGRAFE

Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes
coisas do homem foram conquistadas do que parecia
impossível.

(CHARLES CHAPLIN)

AGRADECIMENTO (S)

Aos meus pais, Gilian Gisleine Carrilho e José Carlos Oliveira Jarros, pela confiança, carinho e incentivo durante toda minha vida.

Aos meus avós, Aparecida Roncolato Carrilho e João Pinha Carrilho, por todo apoio, parceria, carinho e incentivo, grande parte desta conquista só foi possível pelo suporte que me deram.

Aos meus familiares, por todo carinho.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Terezinha Inez Estivalet Svidsinski, pela sua dedicação, competência e profissionalismo, essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa, a quem tenho grande admiração, carinho e respeito.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi, pela atenção, dedicação e ensinamentos na realização deste trabalho.

Às Professoras Drs. Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça e Érika Seki Kioshima Cotica, pela atenção e profissionalismo.

Ao Programa de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá.

À Érika Okuno, parceira de projeto, pela contribuição de amostras biológicas e desenvolvimento deste trabalho.

À Brenda, Lorena e Flavinha, pela colaboração prestada ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de turma do Mestrado em Ciências da Saúde 2014.

Aos colegas de laboratório: Janine, Cristiane, Eliane, Letícia, Isis, Franciele Bonato, Franciele Vilugron, Marina, Fabrício, Karina, Daniella, Vanessa, Glaucia, Maiara, Tânia, Juliana, Lenisa, pelos momentos de descontração, amizade e apoio.

Aos funcionários do laboratório de Micologia Médica e de todo o departamento – LEPAC/UEM.

Aos demais amigos, que apesar da minha constante ausência, sempre mantiveram nossa amizade e me apoiaram em todos os momentos.

À todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

À Deus.

Capacidade de migração sobre Matriz Dérmica Acelular por *Candida* spp. e *Rhodotorula* sp. isoladas de pele

RESUMO

Nas últimas décadas, o prognóstico do paciente queimado mostrou grande melhora com o desenvolvimento de cuidados especiais, debridamento precoce e antibiótico terapia de amplo espectro, mas continua a ser considerável a morbidade e mortalidade, sendo as complicações infecciosas suas principais causas. A matriz dérmica acelular (MDA) é um dispositivo acelular totalmente artificial, que tem a função de controlar a perda de água, evitar a penetração de micro-organismos e permite a migração de células endoteliais e fibroblastos de pacientes para a matriz. O presente estudo teve por objetivo avaliar a capacidade de colonização e penetração de *Candida* spp. e *Rhodotorula* sp. em matriz dérmica utilizados no restauro da derme em pacientes queimados. Foram avaliadas três leveduras isoladas de pacientes com queimaduras e escamas de pele, identificadas como *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Rhodotorula mucilaginosa*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada para fluconazol e anfotericina B. Foram também verificado a capacidade de penetração da matriz dérmica pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (UFC); microscopia de epifluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Foi possível observar que isolados de *Candida* foram sensíveis ao fluconazol, enquanto *R. mucilaginosa* foi resistente. Frente a anfotericina B, *C. parapsilosis* e *R. mucilaginosa* foram sensíveis, enquanto *C. glabrata* mostrou um alto valor de CIM. Em 72 horas, todos os isolados tiveram capacidade de atravessar a MDA. *C. parapsilosis* apresentou o menor crescimento, enquanto que *R. mucilaginosa* teve um intermediário e *C. glabrata* o maior crescimento. Nas placas incubadas durante sete dias, o crescimento de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* aumentaram em 1 Log sobre o teste de três dias. Este é o primeiro estudo que demonstra a habilidade de colonização e penetração de leveduras sapróbias e provenientes da microbiota humana em um dispositivo acelular de regeneração da derme. Todos os isolados apresentaram capacidade de colonização e penetração do dispositivo dérmico, criando um risco potencial para pacientes queimados de desenvolver infecções da ferida o que pode evoluir à septicemia e até mesmo a morte.

Palavras-chave: *Candida* spp.; *Rhodotorula* sp.; Colonização da pele; Migração; Matriz Dérmica Acelular;

Capacity of migration on Acellular Dermal Matrix by *Candida* spp. and *Rhodotorula* sp. isolated from the skin

ABSTRACT

In recent decades, the burned patient prognosis showed great improvement with the development of special care, early debridement and antibiotic broad spectrum therapy, but remains considerable morbidity and mortality, and infectious complications the main causes. The acellular dermal matrix (ADM) is a completely acellular artificial device which has the function of controlling the water loss, prevent penetration of microorganisms and allows migration of endothelial cells and fibroblasts to patients matrix. This study aimed to evaluate the capacity for colonization and penetration of *Candida* spp. and *Rhodotorula* sp. in dermal matrix used in the restoration of dermis in burned patients. They were evaluated three yeasts isolated from patients with burns and skin scales, identified as *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Rhodotorula mucilaginosa*. The minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated for fluconazole and amphotericin B have also verified the capacity of penetration of the dermal matrix by Forming Units Method Colonies (CFU); epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. It was observed that *Candida* isolates were susceptible to fluconazole, while *R. mucilaginosa* was tough. Front amphotericin B, *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa* were sensitive, while *C. glabrata* showed a high value of MIC. In 72 hours, all isolates had the ability to cross the ADM. *C. parapsilosis* showed the lowest growth, while *R. mucilaginosa* had an intermediate and *C. glabrata* the highest growth. All plates were incubated for seven days, the growth of *C. glabrata* and *C. parapsilosis* increased by 1 log over the three-day test. This is the first study that demonstrates the ability of colonization and penetration saprophytic yeast and from the human microbiota in an acellular dermal regeneration device. All isolates showed colonization and penetration of dermal device, creating a potential risk of burn patients develop wound infections which may develop in the sepsis and even death.

Keywords: *Candida* spp.; *Rhodotorula* sp.; Skin colonization; Migration; Acelular Dermal Matrix.

Dissertação elaborada e formatada
conforme as normas da publicação
científica (Capítulo II): *Medical Mycology*
(artigo 1).

SUMÁRIO

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | CAPÍTULO I | 11 |
| 1.1 | Introdução | 11 |
| 1.2 | Capacidade de adesão e colonização | 12 |
| 1.3 | Microbiota humana por fungos | 13 |
| 1.4 | Riscos de colonização por espécies de <i>Candida</i> spp. e <i>Rhodotorula</i> sp. | 14 |
| 1.5 | Colonização da pele por fungos | 15 |
| 1.6 | Justificativa | 16 |
| 1.7 | Objetivos | 17 |
| 1.8 | Referências | 18 |
| 2 | CAPÍTULO II | 23 |
| 2.1 | Artigo 1: “YEAST FROM SKIN COLONIZATION ARE ABLE TO CROSS ACELLULAR DERMAL MATRIX” | 24 |
| 3 | CAPÍTULO III | 48 |
| 3.1 | Conclusões | 48 |
| 3.2 | Perspectivas futuras | 49 |

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Estudos recentes demonstram redução de infecções hospitalares por bactérias nos últimos anos, no entanto a infecção fúngica está aumentando progressivamente, principalmente por patógenos oportunistas e comensais(1). Embora as infecções bacterianas permanecem sendo a principal causa de sepsi em pacientes queimados, infecções fúngicas representam uma ameaça crescente devido ao uso generalizado de antibióticos de amplo espectro, representando um grande desafio no diagnóstico e tratamento correto, principalmente por estarem associados a altas taxas de mortalidade(2, 3). Alguns fatores como o uso de cateter venoso central, sonda vesical de demora, ventilação mecânica, antibiótico de amplo espectro, e queimaduras de grandes extensões e profundas aumentam a incidência de infecções fúngicas(4).

Por serem residentes em membranas, mucosas, pele, trato gastrointestinal e canal vaginal, sabe-se que leveduras possuem capacidade de colonizar tanto superfícies bióticas, quanto abióticas(5, 6). Em condições ambientais favoráveis ao seu crescimento, especialmente em climas quentes e úmidos, ou quando o paciente se encontra imunocomprometido, as leveduras passam a infectar a pele, tornando-se patogênico, podendo causar infecções cutâneas e/ou generalizada(5, 7).

Atualmente, o gênero *Candida* é o quarto patógeno identificado como responsável por infecções de corrente sanguínea, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente isolada(8). Mais de 200 espécies já foram descritas, em sua maior parte consideradas microbiota normal, e apenas 10% são conhecidos por serem responsáveis por infecções(9). Manifestações comuns de candidíase superficial, como aftas, estomatite atrófica crônica, candidíase mucocutânea crônica e vulvovaginites são específicas, geralmente auto-limitada em hospedeiros não-imunocomprometidos, e fácil de tratar com medidas de higiene básicas e tratamento local(10). Entre as espécies que estão isolados com frequências mais altas (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) representam mais de 90% de todos os casos diagnosticados, mas a sua frequência relativa varia dependendo da população envolvida, região geográfica, a exposição a antifúngicos e idade(11).

Estudos apontam *Rhodotorula* sp. como parte de microbiota normal, vastamente encontrada na natureza, muitas vezes considerada como contaminante e, assim como leveduras do gênero *Candida*, possuem capacidade de aderir a diversos tipos de superfícies(12). Entretanto, nas últimas décadas, tem-se apresentado como agente patogênico oportunista, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Há relatos na literatura que atuam como agente infeccioso em fungemia, endocardite, meningite, peritonite, ceratite e ventriculite, a

partir de fontes ambientais ou até mesmo da própria microbiota(13-16). Foi classificado como a terceira levedura mais comum isolada a partir de culturas de sangue, sendo a espécie *mucilaginosa* a mais frequentemente envolvida, respondendo por 74% das infecções. É importante salientar que as leveduras pertencentes a este gênero apresentam um alto nível de resistência ao fluconazol e maior tolerância para o itraconazol(17, 18).

Infecções fúngicas se destacam principalmente em indivíduos considerados imunocomprometidos, devido à falta de capacidade das defesas imunitárias em combater o fungo. Podemos considerar grupos de risco: pacientes HIV positivos, neutropênicos, idosos, pacientes com grandes áreas de queimaduras, entre outros. Recentemente foi descrito que, entre 30 e 60% de pacientes queimados têm, pelo menos, uma cultura positiva para *Candida* sp., com a incidência de candidemia entre 3-5%(11). Pacientes queimados possuem fatores de risco para a colonização e infecção por *Candida* sp., tais como perda de barreira da pele, uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro, implantação de cateteres, admissão na UTI, nutrição parenteral total, ventilação mecânica invasiva e profilaxia de úlcera de estresse. Este risco é aumentado em pacientes com superfície total do corpo afetado mais de 30%, com queimaduras de segundo grau profundas e terceiro grau, e aqueles com superfície corporal queimada que não tenha sido enxertado após 28 dias(19-21).

CAPACIDADE DE ADESÃO E COLONIZAÇÃO

Os micro-organismos em geral são capazes de desenvolver mecanismos que permitem a colonização ou infecção no hospedeiro, muitos patógenos como *Candida* sp. e *Rhodotorula* sp., expressam uma série de estratégias específicas para se estabelecer, colonizar, causar doenças e superar as defesas de hospedeiros susceptíveis, a esses atributos nomeamos “fatores de virulência”. Estes fatores aumentam a eficácia no desenvolvimento de infecções, dependendo do estágio e também da natureza da resposta do hospedeiro. Adesão, formação de biofilme, polimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de enzimas extracelulares e toxinas constituem os principais fatores que conferem a habilidade de colonizar e posteriormente causar a infecção(22).

Para que aconteça o processo de colonização ou infecção, é necessário que ocorra primeiro a adesão do micro-organismo à superfície alvo, sendo fundamental a presença de receptores específicos, como adesinas na membrana externa para a fixação da levedura(5). Sabe-se que leveduras se adaptam facilmente ao corpo humano, e pode colonizá-lo sem produzir doença. Esta relação de equilíbrio entre levedura e hospedeiro é ocasionada pela manutenção da integridade das barreiras teciduais, pela relação harmônica da microbiota

residente e pelo funcionamento adequado do sistema imunológico humano(23). A colonização é um pré-requisito para o desenvolvimento da invasão do tecido pela levedura, promovendo modificações de micro-organismos da microbiota endógena que promove o crescimento excessivo das leveduras em diferentes superfícies(24). A adesão de leveduras sobre superfícies bióticas ou abióticas, é influenciada por fatores como a formação do tubo germinativo, disponibilidade de carboidratos, pH, temperatura, produção de fosfolipases, de proteases e de outras enzimas extracelulares(5, 25, 26).

A habilidade em formar biofilme sobre as diversas superfícies é uma característica que resulta na estabilidade da adesão da levedura ao alvo. O biofilme é uma comunidade microbiana, com característica de organização de células que estão irreversivelmente aderidas e envoltas a uma matriz extracelular de substâncias poliméricas que a própria levedura produz, conferindo uma elevada resistência aos agentes antifúngicos(27, 28). Geralmente são constituídos por células fúngicas que exibem um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição de genes, quando comparadas as células de vida livre. O processo da formação de biofilme ocorre aproximadamente de 24 a 48 horas(27, 29, 30).

MICROBIOTA DA PELE HUMANA

A pele é o maior órgão do corpo humano e age como uma barreira, tanto contra a invasão microbiana, quanto para a termorregulação e secreção de vários fluídos, servindo para mediar as interações com o ambiente externo. É colonizada por um conjunto de diversos micro-organismos como bactérias, fungos e vírus, pois fornece um ambiente ideal(31). Sabe-se que os micro-organismos residentes ajudam a prevenir a colonização por micro-organismos patogênicos, que podem vir a causar uma doença. Entretanto, sob certas condições, membros da microbiota residente podem causar doenças(32, 33).

A quantidade e variedade de organismos na pele, pode variar de acordo com a localidade, por exemplo, o couro cabeludo, axilas e virilha, abrigam as maiores e mais diversificadas populações de bactérias, devido aos numerosos folículos capilares, glândulas sebáceas e glândulas écrinas. A microbiota residente é composta principalmente por bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, entre outros(34). Em comparação com as bactérias, sabe-se muito pouco sobre os outros membros da microbiota residente da pele. Estudos afirmam que, a microbiota fúngica é dominada por leveduras, sendo o gênero *Malassezia* predominantes na maioria dos nichos do corpo humano(35). Entretanto, existe uma diversidade fúngica, que compreende também outros gêneros, tais como *Rhodotorula*, *Candida*, entre outros(36).

RISCO DE COLONIZAÇÃO POR ESPÉCIES DE CANDIDA SPP. E RHODOTORULA SP.

A principal fonte de infecção *Candida* é a colonização endógena, quando ocorre a supressão da bacteriana normal do trato gastrointestinal, através do uso de antibióticos de amplo espectro ou antineoplásicos, facilitando a proliferação de fungos e aumentando os riscos de fenômenos de translocação, podendo chegar à corrente sanguínea(37). Neutropenia, disfunção dos neutrófilos, e rompimento de barreiras mucosas são os principais fatores de risco para infecções disseminadas(38). Estudos recentes apontam que, entre 30 a 63% dos pacientes que sofreram queimaduras, apresentam pelo menos uma cultura positiva para *Candida*, e apresentam a mortalidade bruta associada de 30 a 90%(21). *C. albicans* é descrita como a causa mais frequente de candidemia, sendo considerado o quarto patógeno mais comum isolado a partir de hemoculturas em pacientes de UTI. No entanto, espécies *Candida* não-*albicans* emergiram durante as últimas décadas, e recente estudo sobre candidemia revelou a taxa mais elevada de *C. parapsilosis*, seguido por *C. glabrata* e *C. albicans*(39).

C. parapsilosis é descrita como uma espécie frequente colonizadora das mãos de profissionais da saúde em hospitais, e é um dos principais agentes de candidíase invasiva(40). Indivíduos que apresentam maior risco de infecção grave são recém-nascidos e pacientes em unidades de terapia intensiva(38). É em geral, suscetível a maior parte dos antifúngicos, entretanto há relatos de amostras clínicas com menor sensibilidade à azóis e equinocandinas(41). Infecções por *C. glabrata* estão relacionadas a grandes cirurgias abdominais, tumores sólidos, pacientes idosos, neonatos neutropênicos, pacientes transplantados e recebendo terapias com corticoides(41, 42). São consideradas como a segunda causa de candidemia em países do norte e centro da Europa e EUA. Por apresentar resistência intrínseca a azóis, as infecções por *C. glabrata* representam um grande desafio para o tratamento e estratégias profiláticas empíricas(37, 38).

Além da candidemia, infecções causadas por outras leveduras, como *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Malassezia*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula*, e por fungos filamentosos, sobretudo das espécies *Aspergillus*, *Fusarium* e *Mucor*, têm sido isolados em diferentes amostras de pacientes queimados. Embora emergentes e raros como infecção, sua importância reside no perfil de virulência e resistência a antifúngicos apresentado por estes fungos, já que as opções de tratamento com antifúngico são limitadas(3).

No gênero *Rhodotorula*, três espécies se destacam por sua importância clínica: *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta*. Responsável por até 79% das infecções, *R. mucilaginosa* é a causa mais frequente de fungemias, seguida por *R. glutinis* com 7,7%. A mortalidade geral

de fungemia por *Rhodotorula* é de 15%(43). Em testes de identificação automatizadas de hemoculturas positivas, *Rhodotorula* sp. sugere reatividade cruzada com espécies de *C. glabrata* e *C. krusei*, que pode induzir a um tratamento inapropriado com equinocandinas, já que são intrinsecamente resistentes a equinocandinas e azóis. O tratamento de escolha ideal é feito com anfotericina B(37, 38, 44).

COLONIZAÇÃO POR FUNGOS EM PACIENTES QUEIMADOS

Entre os grupos de alto risco para o desenvolvimento de infecções por fungos, inclui-se pacientes queimados. As lesões provocadas pelas queimaduras funcionam como uma porta de entrada ideal para a infecção invasiva, enquanto ocorre uma disfunção imune substancial. O tecido resultante do ferimento necrótico é um excelente meio para colonização e crescimento de vários micro-organismos, como fungos(39). Além disso, tratamento das queimaduras expõem o paciente a vários outros fatores que favorecem a infecção fúngica, incluindo dispositivos como Cateter Venoso Central (CVC) (arterial e venosa), cateteres urinários, tubos endotraqueais, a nutrição parentérica total, ventilação mecânica prolongada, corticoterapia sistêmica, terapia de suporte com aminas vasoativas e inotrópicos(19, 45).

É muito difícil de distinguir leveduras pertencentes a microbiota, de leveduras pertencentes a infecção invasiva propriamente dita no paciente de alto risco, sendo que apenas 5-15% dos pacientes internados já estão colonizados no momento de entrada no ambiente hospitalar, mas esta proporção aumenta com o tempo de internação e exposição a fatores que podem favorecer a infecção. É sugerido que, quando comprovado a colonização em mais de dois sítios no corpo do paciente, se inicie uma estratégia terapêutica com antifúngicos, afim de prevenir uma infecção(46, 47).

A administração de certos fármacos pode aumentar as chances de uma infecção fúngica, por exemplo, o Propofol, administrado frequentemente em pacientes críticos como um agente sedativo, tem sido associado com um risco maior de infecção, devido ao seu veículo lipídico, que promove a brotamento da levedura e reduz acesso ou permeabilização antifúngicos(48). Também albumina humana, administrada nestes pacientes, tem sido associada a um rápido início e a propagação de infecções fúngicas(49).

Pacientes queimados são submetidos a vários procedimentos invasivos, que os tornam mais susceptíveis a infecções bacterianas e fúngicas, com frequente desenvolvimento de *burnshock* ou do quadro de sepse. O procedimento inicial para a reconstituição da área queimada é a assepsia, debridamento do local queimado, posteriormente é implantado uma matriz dérmica, após a cicatrização da matriz dérmica, é realizado o enxerto de pele(50).

Como parte do processo de regeneração da derme, que antecede o enxerto de pele a ser transplantada, a matriz de regeneração dérmica é um dispositivo totalmente artificial, acelular e composta de duas camadas. Na camada superior, é encontrada uma fina lâmina de silicone, semelhante à epiderme que tem a função de controlar a perda de água e prevenir contra a invasão de bactérias. A camada inferior, por sua vez possui tramas altamente porosas, composta de colágeno bovino e condroitina 6-sulfato que é derivado de cartilagem de tubarão. O tamanho dos poros da camada inferior, permite a migração das células endoteliais e fibroblastos dos pacientes à matriz. Assim, a estrutura anatômica e a composição química da derme artificial atuam como modelo para a síntese de uma estrutura semelhante à derme do paciente(51, 52). Apesar de auxiliar na reconstituição da derme, a matriz dérmica proporciona um ambiente favorável ao crescimento de micro-organismo, funcionando como uma porta para infecções, até então relatadas apenas por bactérias(53).

JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, o aumento de mortalidade por infecções hospitalares por fungos chama atenção, sendo as espécies do gênero *Candida* as mais frequentes. São residentes em mucosas, pele, trato gastrointestinal e canal vaginal, normalmente não causam nenhum dano. Entretanto, quando as condições ambientais são favoráveis, especialmente em climas quentes e úmidos ou as defesas imunitárias encontram-se debilitadas, as leveduras passam a infectar a pele, podendo tornar-se comensais e patogênicos, causando infecção cutânea ou mesmo generalizada e fatal⁵³. Como um comensal normal da pele humana, *C. parapsilosis* representa uma grande ameaça para os pacientes que interagem com os profissionais de saúde colonizados, em particular quando há violações em protocolos de lavagem das mãos(54). *Rhodotorula* tradicionalmente são conhecidas como saprófitas, capazes de colonizar epitélio humano, via respiratória e gastrointestinal, entretanto têm-se apresentado como agente patogênico oportunista, a partir de fontes ambientais ou até mesmo da própria microbiota, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como exemplo pacientes que sofreram queimaduras graves. Foi classificado como a terceira levedura mais comum isolada a partir de culturas de sangue, sendo a espécie *R. mucilaginosa* a mais frequentemente envolvida(12, 17).

Desta forma, faz-se necessário avaliar a capacidade de infecção e colonização por micro-organismos oportunistas na reconstituição da derme, seja na etapa de cicatrização da matriz dérmica (pré-transplante de pele) ou após o enxerto de pele.

OBJETIVOS

Avaliar a capacidade de invasão e colonização da matriz dérmica, utilizada no restabelecimento da derme de pacientes queimados, por *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

ESPECÍFICOS

- Reativar e confirmar a identificação das leveduras selecionadas, provenientes de amostras de pele.
- Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de cada isolado.
- Padronizar os testes qualitativos e quantitativos que avaliam a capacidade de invasão da matriz.
- Comparar a capacidade de invasão entre os isolados (*C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *R. mucilaginosa*).
- Verificar o potencial de invasão e colonização da matriz dérmica de cada isolado a partir de imagens de microscopias de epifluorescência e microscopia eletrônica de varredura.

REFERENCIAS

1. Pedrosa AF, Rodrigues AG. Candidemia in burn patients: figures and facts. *J Trauma* 2011; 70(2): 498-506.
2. Moore EC, Padiglione AA, Wasiak J, Paul E, Cleland H. Candida in burns: risk factors and outcomes. *J Burn Care Res* 2010; 31(2): 257-63.
3. Renau AI, Garcia-Vidal C, Salavert M. [Invasive yeast infections in severely burned patients]. *Rev Iberoam Micol* 2016; 33(3): 160-9.
4. Horvath EE, Murray CK, Vaughan GM, *et al.* Fungal wound infection (not colonization) is independently associated with mortality in burn patients. *Ann Surg* 2007; 245(6): 978-85.
5. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of Candida: a mini review. *Oral diseases* 2008; 14(7): 582-590.
6. Borghi E, Borgo F, Morace G. Fungal Biofilms: Update on Resistance. *Adv Exp Med Biol* 2016.
7. Coutinho BBdA, Balbuena MB, Anbar RA, *et al.* Epidemiological profile of patients hospitalized at the burned nursery of Beneficent Association of Campo Grande Santa Casa/MS. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica* 2010; 25: 600-603.
8. Messier C, Epifano F, Genovese S, Grenier D. *Inhibition of Candida albicans biofilm formation and yeast-hyphal transition by 4-hydroxycordoin*. Phytomedicine. Germany: 2011 Elsevier GmbH; 2011: 380-3.
9. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on Candida species. *Clin Infect Dis* 1995; 20(6): 1526-30.
10. Leleu G, Aegerter P, Guidet B. Systemic candidiasis in intensive care units: a multicenter, matched-cohort study. *J Crit Care* 2002; 17(3): 168-75.
11. Ha JF, Italiano CM, Heath CH, *et al.* Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. *Burns* 2011; 37(2): 181-95.

12. Nunes JM, Bizerra FC, Ferreira RC, Colombo AL. *Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental Rhodotorula species isolates*. *Antimicrob Agents Chemother*. United States 2013: 382-9.
13. Menon S, Gupta HR, Sequeira R, *et al*. *Rhodotorula glutinis meningitis: a case report and review of literature*. *Mycoses* 2014; 57(7): 447-51.
14. Simon MS, Somersan S, Singh HK, *et al*. *Endocarditis caused by Rhodotorula infection*. *J Clin Microbiol*. United States 2014: 374-8.
15. Giovannini J, Lee R, Zhang SX, Jun AS, Bower KS. *Rhodotorula keratitis: a rarely encountered ocular pathogen*. *Case Rep Ophthalmol*. Switzerland 2014: 302-10.
16. Kiehn TE, Gorey E, Brown AE, Edwards FF, Armstrong D. *Sepsis due to Rhodotorula related to use of indwelling central venous catheters*. *Clin Infect Dis* 1992; 14(4): 841-6.
17. Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. *Susceptibility profile of 29 clinical isolates of Rhodotorula spp. and literature review*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 55(3): 312-316.
18. Zaas AK, Boyce M, Schell W, *et al*. *Risk of fungemia due to Rhodotorula and antifungal susceptibility testing of Rhodotorula isolates*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 5233-5.
19. Ballard J, Edelman L, Saffle J, *et al*. *Positive fungal cultures in burn patients: a multicenter review*. *J Burn Care Res* 2008; 29(1): 213-21.
20. Brusselaers N, Monstrey S, Vogelaers D, Hoste E, Blot S. *Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality*. *Crit Care* 2010; 14(5): R188.
21. Vinsonneau C, Benyamina M, Baixench MT, *et al*. *Effects of candidaemia on outcome of burns*. *Burns* 2009; 35(4): 561-4.
22. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67(3): 400-28, table of contents.
23. Schulte DM, Sethi A, Gangnon R, *et al*. *Risk factors for Candida colonization and Co-colonization with multi-drug resistant organisms at admission*. *Antimicrob Resist Infect Control* 2015; 4: 46.

24. Eggimann P, Pittet D. Candida colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive Care Med* 2014; 40(10): 1429-48.
25. Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, *et al.* Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20(2): 52-4.
26. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. *Int J Microbiol* 2014; 2014: 456878.
27. Del Pozo JL, Canton E. [Candida biofilm-related infections]. *Rev Iberoam Micol* 2015.
28. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol* 2015; 69: 71-92.
29. Sanguinetti M, Posteraro B. Diagnostic of Fungal Infections Related to Biofilms. *Adv Exp Med Biol* 2016.
30. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. *Adv Exp Med Biol* 2016.
31. Muszer M, Noszczyńska M, Kasperkiewicz K, Skurnik M. Human Microbiome: When a Friend Becomes an Enemy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2015; 63(4): 287-98.
32. James G, Swogger E, deLancey-Pulcini E. Microbial Ecology of Human Skin and Wounds. 2008.
33. SanMiguel A, Grice EA. Interactions between host factors and the skin microbiome. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(8): 1499-515.
34. Weyrich LS, Dixit S, Farrer AG, Cooper AJ. The skin microbiome: Associations between altered microbial communities and disease. *Australas J Dermatol* 2015; 56(4): 268-74.
35. Tomic-Canic M, Perez-Perez GI, Blumenberg M. Cutaneous microbiome studies in the times of affordable sequencing. *J Dermatol Sci* 2014; 75(2): 82-7.
36. Egert M, Simmering R. The Microbiota of the Human Skin. *Adv Exp Med Biol* 2016; 902: 61-81.
37. Ruiz Camps I, Jarque I. [Invasive yeast infections in neutropenic patients]. *Rev Iberoam Micol* 2016; 33(3): 170-5.

38. Miceli MH, Diaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 2011; 11(2): 142-51.
39. Lotfi N, Shokohi T, Nouranibaladezaei SZ, Nasrolahi Omran A, Kondori N. High Recovery Rate of Non-albicans Candida Species Isolated From Burn Patients With Candidemia in Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(10): e22929.
40. Yildirim M, Sahin I, Kucukbayrak A, *et al.* Hand carriage of Candida species and risk factors in hospital personnel. *Mycoses* 2007; 50(3): 189-92.
41. Quindos G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* 2014; 31(1): 42-8.
42. Nucci M, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M, *et al.* [Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. Grupo Proyecto Epico]. *Rev Iberoam Micol* 2013; 30(3 Suppl 1): 179-88.
43. Tuon FF, Costa SF. Rhodotorula infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25(3): 135-40.
44. Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, *et al.* Rare opportunistic (non-Candida, non-Cryptococcus) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J Infect* 2012; 64(1): 68-75.
45. Fochtmann A, Forstner C, Hagmann M, *et al.* Predisposing factors for candidemia in patients with major burns. *Burns* 2015; 41(2): 326-32.
46. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994; 220(6): 751-8.
47. Charles PE, Dalle F, Aube H, *et al.* Candida spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Intensive Care Med* 2005; 31(3): 393-400.
48. Costa-de-Oliveira S, Araujo R, Silva-Dias A, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Propofol lipidic infusion promotes resistance to antifungals by reducing drug input into the fungal cell. *BMC Microbiol* 2008; 8: 9.
49. Rodrigues AG, Araujo R, Pina-Vaz C. Human albumin promotes germination, hyphal growth and antifungal resistance by *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2005; 43(8): 711-7.

50. Aldunate JLCB, Vana LPM, Fontana C, Ferreira MC. Use of dermal matrix and negative pressure dressings for the treatment of contractures in burn patients. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica* 2012; 27: 369-373.
51. Guerra ACPCdS, Antunes MPdS, Ferreira JPA, Reis GMDd. Queimadura com exposição óssea dos membros inferiores: reconstrução com matriz de regeneração dérmica. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica* 2011; 26: 174-180.
52. Nyame TT, Lemon KP, Kolter R, Liao EC. High-throughput assay for bacterial adhesion on acellular dermal matrices and synthetic surgical materials. *Plast Reconstr Surg* 2011; 128(5): 1061-8.
53. Fahrenbach EN, Qi C, Ibrahim O, Kim JY, Alam M. Resistance of acellular dermal matrix materials to microbial penetration. *JAMA Dermatol* 2013; 149(5): 571-5.
54. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008: 606-25.
55. Murray CK, Loo FL, Hospenthal DR, *et al.* Incidence of systemic fungal infection and related mortality following severe burns. *Burns* 2008; 34(8): 1108-12.

CAPÍTULO II

**Artigo 1: “YEAST FROM SKIN COLONIZATION ARE ABLE TO CROSS
ACELLULAR DERMAL MATRIX (ADM)”**

YEAST FROM SKIN COLONIZATION ARE ABLE TO CROSS ACELLULAR DERMAL
MATRIX (ADM)

YEAST ON ACELLULAR DERMAL MATRIX (ADM)

Isabele Carrilho Jarros¹; Érika Okuno¹; Maiara Ignacio Costa¹; Patricia de Souza Bonfim-Mendonça¹; Melyssa Fernanda Norman Negri¹; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski^{1*}.

¹Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

***Corresponding author:** Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Division of Medical Mycology, Teaching and Research Laboratory in Clinical Analysis –
Department of Clinical Analysis of State University of Maringá – Paraná – Brazil

Av. Colombo, 5790

CEP: 87020-900

Maringá, PR., Brazil

Phone: +5544 3011-4809

Fax: +5544 3011-4860

E-mail: tiesvidzinski@uem.br or terezinha.svidzinski@gmail.com

Keywords: *Candida* spp.; *Rhodotorula* sp.; Skin colonization; Crossing; Acellular Dermal Matrix;

Abstract

In recent decades, the burned patient prognosis showed great improvement with the development of special care. The acellular dermal matrix (ADM) is a totally artificial acellular device that has the function to control water loss, prevent penetration from bacteria and allow migration of endothelial cells and fibroblasts from patient tissues. However, little is known about its relation with yeast. The present study aimed to evaluate the capacity of colonization and migration of some commensal yeasts, isolated from skin. Three clinical isolates from burned patients and skin scales, identified as *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Rhodotorula mucilaginosa* were used. The minimum inhibitory concentration of antifungals and invasiveness of the ADM were evaluated. *Candida* spp. showed susceptibility to fluconazole while *R. mucilaginosa* was resistant. For amphotericin B, *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa* were susceptible, while *C. glabrata* showed high MIC value. In three days, all isolates had ability to cross the ADM. *C. parapsilosis* showed the lowest growth, while *R. mucilaginosa* had an intermediate and *C. glabrata* the highest growth. In the plates incubated for seven days, the growth of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* increased by 1 log over the three days assay. All isolates have the capacity for colonization and migration of the device, creating a potential risk to burned patients who can develop severe and even fatal clinical conditions.

Introduction

According to World Health Association, the burn is a problem of global public health.

In the last decade the burned patient prognosis showed great improvement with the development of curative care, early debridement and broad-spectrum antibiotic, but it remains with considerable morbidity and mortality, and infections are among the main complications(1, 2). It has been reported that 50-75% of morbidity in patients with burns is related to infections,

which has been a constant threat to human health throughout history, because it prevents infection and delayed wound healing and can lead to death(3). The most common pathogenic agents that cause serious infections in patients with burns include Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*(3-6).

However, according to some authors there is a reduction in bacterial infection in burned patients (Pedrosa et al. 2011 and Constantinides et al. 2008), on the other hand the fungal infection is increasing steadily, frequently leading to sepsis or *Burnshork*(7-9). It is important to note that fungal infections has been steadily increasing in recent decades and the genus *Candida* has been the main agent of these infections in burned patients(10). Moreover, this statement is not completely understood yet.

Burns in large and deep areas increase the incidence of fungal infections especially in severe patients who are exposed to other factors such as the use of central venous catheter, urinary catheter, mechanical ventilation, broad-spectrum antibiotic(11). It should also be noted that the human skin is colonized by fungi, like in other parts of the body. The suppression of immunity and elimination of bacterial flora by antibiotic increase the likelihood of the development of the fungal infection in burned patients(8).

The initial procedure for the recovery of the burned area is aseptical debridement of the burned site, a dermal matrix is then implanted, after the healing of the dermal matrix, is performed the skin grafting(12). The dermal regeneration matrix is a totally artificial acellular

device and it is composed of two layers: the top layer it is a thin silicon blade, similar to the epidermis that has the function to control water loss and prevent bacteria invasion. The bottom layer has highly porous webs, composed of bovine collagen and chondroitin 6-sulfate, which are derived from shark cartilage. The pore size of the lower layer allows migration of endothelial cells and fibroblasts from the patient to the matrix. Therefore, the anatomical structure and chemical composition of the artificial dermis act as a template for the synthesis of a similar structure to the skin of the patient(3, 13). However, this process may be impaired due to the growth of opportunistic microorganisms.

Candida spp. are resident in several parts of human organism. Usually it does not cause any harm, however when environmental conditions are favorable, especially in hot, humid conditions or when immune defenses are weakened, the yeast starts to infect the skin and can become pathogenic, causing skin infection or even widespread and fatal infections(14). Burned patients with damaged skin barrier protection are susceptible to severe *Candida* infections(15). According to Norbury et al 2016, fungi like *Candida* non-*C. albicans* (CNCA) have emerged as the maleficent cause of invasive infections in burned patients alongside with resistant bacteria. However, little is known about the physiopathology of these infections in burned patients(16).

Besides it is important to highlight that *Rhodotorula* sp. are traditionally known as saprophytes, yeasts able to colonize the human epithelium, respiratory tract and gastrointestinal tract, although they have been shown as opportunistic pathogens from environmental sources or even from the own microbiota, especially in immunocompromised patients, for example patients who have suffered severe burns. It was classified as the third most common yeast isolated from blood cultures, and the species *R. mucilaginosa* was mostly often involved(17, 18).

This way, the present study aimed to evaluate the capacity of colonization and migration of *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Rhodotorula mucilaginosa* in dermal matrix used in the restoration of the burned patients derm.

Materials and methods

Clinical Isolates

For this study, isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* from skin lesions of burned patients, and *Rhodotorula mucilaginosa* from skin scales were used. These yeast belonged to the Micoteca from the Medical Mycology Laboratory, Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (Lepac/UEM), with the respective identification: *C. parapsilosis* (H6), *C. glabrata* (H27) and *R. mucilaginosa* (Rh9708). The yeasts were stored in Sabouraud Dextrose Broth (SDB; Difco™, USA) with glycerol at -80 °C. Before experiments, the isolates were subcultured in Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Difco™, USA) and CHROMagar *Candida*® (Difco™, USA), to check the culture's purity. After reactivating, the yeasts were confirmed with classical proofs of identification, such as the observation of morphology and biochemical tests(19).

Antifungal susceptibility profile

The antifungal susceptibility profile was determined against amphotericin B (Sigma, Belgium) and fluconazole (Sigma, Belgium). The test was performed by a microdilution assay in broth, according to the guideline of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), and M27-A3 document. Concentrations ranged between 0.125 and 64 µg/ml for fluconazole and between 0.03 and 16 µg/ml for amphotericin B. Suspensions were tested with antifungal solutions in 96-well microplates (Nunclon Delta; Nunc) incubated for 48 h at 35 °C for *C. parapsilosis* and *C. glabrata*, and 25 °C for *R. mucilaginosa*. *C. tropicalis* ATCC 750 was used as a control and the reading of microplates was performed at 405 nm (Expert Plus Microplate

Reader; ASYS). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of amphotericin B was defined as the lowest concentration that caused complete inhibition of growth. The MIC of fluconazole was defined as the lowest concentrations that inhibited 50% of growth. Results were given as: susceptible (S); susceptible-dose dependent (S-DD); and resistant (R). Cut-off points were: S ≤ 8 ; S-DD 16–32; and R ≥ 64 for fluconazole, according to CLSI (2008) M27-A3 document. CLSI (2008) has not determined breakpoints for amphotericin B, so the interpretation was based on the recent literature. For amphotericin B, resistant isolates were defined as isolates with MIC $>1 \mu\text{g/ml}$ (20, 21).

Acellular Dermal matrix

Acellular Dermal Matrix (ADM) (Artificial Dermis PELNAC fenestrated type, size 120mmx240mm; Gunze Ltd. Kyoto, Japan) is a material used in the restoration of dermis in patients that suffered severe burns. The matrix has two sides, one hydrophobic (front) with a thin silicon blade, and the other hydrophilic (verse). To prepare the ADM for assay, squares of $1 \times 1 \text{cm}^2$ in area were cut with a scalpel aseptically, and the pieces of the array were hydrated for 15 min with sterile saline (0.9% NaCl) at room temperature, according to the manufacturer's instructions. In 24-well culture microplates (TPP, Switzerland) containing 5 ml of SDA with chloramphenicol, the pieces of hydrated ADM were deposited aseptically, with the verse in contact with the agar.

***In vitro* ADM colonization**

To assess the colonization ability of the yeast modeled with ADM *in vitro*, the quantitative analysis by Colony Forming Units (CFU) and qualitative analysis (by stamping the matrix on agar and scanning with electron microscopy) were conducted. For this, in the center (front) of the ADM was added 20 μl of a suspension containing 1×10^7 /ml of the *C. parapsilosis* or *C. glabrata* or *Rhodotorula mucilaginosa* in sterile saline. Tests were performed in triplicate

and in two independent days. Positive control (inoculum and SDA) and negative control (ADM and SDA) were included. The plates were incubated at 35°C for three and seven days.

Evaluation of ADM migration by yeast

For quantitative analysis, after incubation period (three and seven days) the ADM containing the different strains were removed from each well and discharged into eppendorfs with 1 ml PBS and mixed vigorously on a vortex for 1 min. The number of viable yeast was then calculated by spread-plating suitable diluted samples onto SDA, followed by incubation at 37°C for 48h. The quantity of viable yeast was calculated by CFU enumeration.

For qualitative analysis, after incubation in the same period the ADM containing the different strains were removed from the wells. Then, both sides (front and verse) were stamped onto SDA plates to assess the passage of the strains across the ADM. Additionally, after seven days of incubation, microscopy techniques (Digital Microscopy, Epi-fluorescence Microscopy and Scanning Electron Microscopy; SEM) were performed to visualize and confirm the passage of the different strains across the ADM. The first step was to evaluate the infected ADM in digital microscope (Color CMOS Sensor, High Speed DSP). For this, the infected ADMs were carefully removed from the 24 well plate, fixed in 100% methanol for 15 min and a photo was taken with digital microscope of the two surfaces of the ADMs (front and verse), in 800x magnification. The second step was to evaluate the infected ADMs in epifluorescence microscope (FL Evos, Live Technologies), performed with the infected ADMs stained with Calcofluor White (Fluka Analytical, Canada), diluted in a proportion of 1:4 in sterile PBS solution for 5 min and excess dye was removed by washing once with sterile PBS solution. The stained matrices were observed under microscope in filter capable of detecting the yeast cell wall (BP 365-370, FT 400, LP 421). Technologies) and brightfield. The third step was conducted with SEM. The infected ADMs were removed from SDA plates and fixed with glutaraldehyde (2.5%) for 2 h. Then, the infected ADMs were dehydrated with a series of

ethanol washes (70, 80, 90, 95, and 100%). The pieces of ADM were fixed on supports, coated with gold-palladium under argon atmosphere using a gold sputter module in a high-vacuum evaporator. Samples were then observed with Shimazu SS-550 Super scan (SHIMADZU, Tokyo, Japan) at 1000 and 3000x magnifications.

Statistical analysis

Data with a non-normal distribution are expressed as the mean +/- standard deviation (SD) of at least three independent experiments. Significant differences among means were identified using analysis of variance (ANOVA) followed by the Kruskal-Wallis test. The data were analyzed using Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Yeast characterization

The yeasts were identified with classical methodology and identification was confirmed as: *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Rhodotorula mucilaginosa*.

From the antifungal susceptibility testing according to CLSI interpretation, we can see (Table 1) that *Candida* species isolates demonstrated susceptibility to fluconazole, with the MIC of 2 $\mu\text{g/ml}$ to *C. parapsilosis* and 8 $\mu\text{g/ml}$ to *C. glabrata*, while the strain of *R. mucilaginosa* was resistant to the highest concentration tested (64 $\mu\text{g/ml}$). On the other hand, for amphotericin B, *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa* were susceptible (0.5 $\mu\text{g/ml}$), while *C. glabrata* showed high MIC value (1 $\mu\text{g/ml}$).

Capacity of yeast colonization and invasiveness in ADM

All isolates were capable of colonizing the ADM, as shown in Figure 2 (A), (G) and (M). In three days, isolates of *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *R. mucilaginosa* were able to cross the ADM and reach the agar located in the lower portion of the polystyrene plate.

Regarding the strains, *C. parapsilosis* showed the lowest growth with 6.56 log (CFU/ml), while *R. mucilaginosa* had an intermediate growth of 7.70 log (CFU/ml) and *C. glabrata* the highest growth: 7.99 log (CFU/ml). However, when evaluating the plates incubated for seven days, the growth of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* increased by 1 log over the three days tested. *R. mucilaginosa* showed no significant difference between the third and the seventh day of the tests (7.63 log) (Fig 1). There were no statistical differences among the isolates.

Within seven days, optical and electronic microscopy showed the formation of a complex structure formed by the yeasts on both sides of ADM. As shown in Figure 2, *C. parapsilosis* had the capacity to produce filamentation on the hydrophobic side, identified as the front, evidenced especially in epifluorescence microscopy (B) and (C). As well as the large increase in growth presented in *C. glabrata* and *R. mucilaginosa* samples and yeasts, not forming filamentous structures (H), (I), (N) and (O). At the bottom of the matrix called verse (E), (F), (K), (L), (Q) and (R), there was an overgrowth of yeast capable of forming complex structures that contribute to the invasion and infection of the ADM, hindering the correct treatment.

Through electronic microscopy, as shown in Figure 3, it was possible to see in more details the growth and architecture formed by the yeast, specially the interaction between the microorganism and the device, at the top and bottom of the ADM. For *C. parapsilosis* it is possible to identify structures like filaments on both sides of the device (A), (B), (C) and (D). As for *C. glabrata* and *R. mucilaginosa* it was found the great growth mentioned above (E), (F), (G), (H), (I), (J), (K) and (L), yet all isolates were potentially invasive and matrix colonizers. The negative control was tested to demonstrate the structure and sterility of ADM (M), (N), (O) and (P).

Discussion

Among the high-risk groups for the development of infections, burned patients are included. The injuries caused by burns act as an ideal entry point for invasive infections which occur in parallel to a substantial patient immune dysfunction. The resulting necrotic tissue injury is an excellent way for colonization and growth of various microorganisms(22). Besides, another important concern is about ADM, nowadays recommended for treatment of infections in burned patients. In the current study we have shown, by the first time that *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *R. mucilaginosa* were capable of colonizing the ADM (Figure 2 A, G and M). These are examples of common skin yeasts, being the two first ones isolated only from wound burns, these findings deserve a reflection on possible risks of these yeast to evolve the infection from ADM as an entry point for invasive candidiasis.

In our previous study, *C. parapsilosis* was among the main yeasts isolated from burned patients (results not shown). In the current study, *C. parapsilosis*, among these three species evaluated, showed the lowest growth, after three days of incubation. Although, in seven days there was a substantial increase in its growth on ADM. Even having the lowest growth, as it can be observed in Figure 2 (B), (C), (E) and (F). In addition, Figure 3 proves the migration ability of *C. parapsilosis* on ADM, and it occurred through the formation of the filaments on both sides of ADM. *C. glabrata* had the highest growth in three days of incubation and after seven days it was significantly increased compared to other isolates, as can be observed in Figure 2 (H), (I), (K) and (L), and Figure 3 (E), (F), (G) and (H). Together these data show the ability of two *Candida* species regarding colonization and migration, indicating a potential source of infection.

In addition, *R. mucilaginosa* growth was considered intermediate compared to the isolates of *Candida* spp., as is illustrated on Figure 3 (I) and (K), there were no differences between three and seven days of incubation. Although studies that relate the ADM migration

with *Rhodotorula* sp. were not found, it is important to remember that these yeasts are environmental or human skin commensal. Interestingly, such as it is referred in this study, they can easily invade the skin(23, 24).

The main concern is that, the wound burn offers high risk for infection, due to its disponibility of nutrients caused by the defense barrier break, once it is often done debridement to remove as much source of infection as possible. However, deep burns are particularly difficult to cure and represent a high risk of infection. It is important to emphasize that ADM provides a clean scaffold for host cellular and vascular in-growth, used in various reconstructive surgery procedures, such as in tissue regeneration in deep burns and for suspension. Providing biomechanical support helps new tissue formation by the interaction with host cells through the modulation of cellular behaviors such as adhesion, migration, proliferation and differentiation(5, 6).

Furthermore, it modulates the inflammatory response and the remodeling of the newly formed extracellular matrix. Despite these important and positive contribution, we need to admit ADM can provide a favorable environment for growth of microorganisms(25).

There are studies that link the migration of ADM with bacteria, but not with satisfactory results for yeasts(3, 6). This is also the first study to report the ability of migration of yeast from saprophytic and human microbiota into an acellular device used for reconstitution of the dermis. In three days, isolates of *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *R. mucilaginosa* were able to cross the ADM and reach the agar located in the lower portion of the polystyrene plate.

The colonization is a prerequisite for the development of tissue invasion by yeast, promoting changes in the microorganisms of the endogenous microbiota that promotes excessive growth and can facilitate the yeast on different surfaces(26).

Candidiasis is an emerging infectious disease in patients with severe burns, with estimative between 2 and 21% of invasive candidiasis, and attributable mortality between 14

and 70%(8, 27, 28). Despite *C. albicans* being the most often species responsible for fungal infections, *Candida non-C. albicans* (CNCA) species such as *C. parapsilosis* and *C. glabrata* have been increasing in the last decades(27). *C. glabrata* is commensal colonizing the intestinal tract, and have great impact on human health as a candidemia agent and other invasive *Candida* infections, mainly in immunocompromised patients and those treated in the intensive care unit(28, 29). Despite being a normal human skin commensal, *C. parapsilosis* is a major threat to patients, which interact with colonized health professionals, particularly when there are violations in washing hands protocols, allowing cross-infection related to this species(30).

Candida sp. is the most common genus in bloodstream infections caused by fungi, but the number of less common yeasts like *Rhodotorula* sp. has increased, regarded as emerging pathogens, they are mostly considered as contaminants or of low virulence(17). Recent studies point to the increase of infections especially due to *R. mucilaginosa* among the most frequent. There are reports showing fungemia by this agent as well as endocarditis, meningitis, peritonitis, keratitis and ventriculitis, its origin is environmental or from the patient microbial sources(31-34). Systemic infections by *Rhodotorula* spp. are considerable complex, due to the naturally resistance to azole antifungals(24).

It is important to highlight that the current study found low MIC values for the most of *in vitro* evaluated antifungals. It suggests that the great risk of severe fungal infection is less due to antifungal resistance and more due to patient debility or fungal virulence. Regarding the sensibility test, this study shows all isolates were susceptible to low MIC in relation to amphotericin B, suggesting no antifungal resistance. About fluconazole, *Candida* species were susceptible, while *R. mucilaginosa* was resistant to the highest concentration tested, on the other hand this species was susceptible to amphotericin B. According to Pappas et al. 2016 fluconazole is the drug choice for bloodstream infection therapy in non-neutropenic patients who have infections with *C. glabrata* or *C. parapsilosis*(35). However recent studies have

shown that *C. glabrata* has a higher tolerance to fluconazole or even resistance to it in comparison to other species. In this case it is recommended to administer voriconazole or lipid formulation amphotericin B(36).

Still, it is important to emphasize that *C. parapsilosis* has high capacity to form biofilm on different biotic and abiotic surfaces(37, 38). In the current study was possible to observe that *C. parapsilosis* formed a complex structure as hyphae, shown on Figure 2 (B), (C), (E) and (F). This organization contributes to the overall stability of biofilm architecture, and allows us to hypothesize they act as a support scaffolding to other yeast cells and hyphae, aiding the yeast to more easily perform the migration, on tissues or devices like ADM. The biofilm is a complex structure that confers the ability to yeast to develop several other phenotypic and genotypic characteristics, including resistance to most antifungal agents, making the therapy more difficult(39).

Finally, this was the first study showing these yeasts are able to grow and to invade the ADM in just 72 hours, and multiply significantly after this period. That way, it is possible to conclude that commensal yeasts which are easily found in hospital environments, in equipment surfaces or skin health professionals and patients create a potential risk to immunosuppressed patients, such as those who have suffered some type of burn. Moreover, the ADM provides a favorable environment to the growth of microorganisms which can lead to sepsis and even death.

References

1. Murray CK, Loo FL, Hospenthal DR, et al. Incidence of systemic fungal infection and related mortality[ICJ1] following severe burns. *Burns*. 2008; 34 (8):. 1108-1112
2. Constantinides J, Misra A, Nassab R, Wilson Y. *Absidia corymbifera* fungal infection in burns: a case report and review of the literature. *J Burn Care Res*. 2008; 29 (2):. 416-419
3. Nyame TT, Lemon KP, Kolter R, Liao EC. High-throughput assay for bacterial adhesion on acellular dermal matrices and synthetic surgical materials. *Plast Reconstr Surg*. 2011; 128 (5):. 1061-1068
4. Lan Y, Li W, Jiao Y, Guo R, Zhang Y, Xue W. Therapeutic efficacy of antibiotic-loaded gelatin microsphere/silk fibroin scaffolds in infected full-thickness burns. *Acta Biomater*. 2014; 10 (7):. 3167-3176
5. Barges L, Boyer S, Leclerc T, Duhamel P, Bey E. Incidence and microbiology of infectious complications with the use of artificial skin Integra in burns. *Ann Chir Plast Esthet*. 2009; 54 (6):. 533-539
6. Fahrenbach EN, Qi C, Ibrahim O, Kim J, Alam M. Resistance of acellular dermal matrix materials to microbial penetration. *JAMA Dermatol*. 2013; 149 (5):. 571-575
7. Moore EC, Padiglione AA, Wasiaik J, Paul E, Cleland H. *Candida* in burns: riskfactors and outcomes. *J Burn Care Res*. 2010; 31 (2):. 257-263
8. Ballard J, Edelman L, Saffle J, et al. Positive fungal cultures in burn patients: a multicenter review. *J Burn Care Res*. 2008; 29 (1):. 213-221
9. Pedrosa AF, Rodrigues AG. Candidemia in burn patients: figures and facts. *J Trauma*. 2011; 70 (2):. 498-506
10. Vinsonneau C, Benyamina M, Baixench MT, et al. Effects of candidemia on outcome of burns. *Burns*. 2009; 35 (4):. 561-564
11. Coutinho BBdA, Balbuena MB, Anbar RA, Anbar RA, Almeida KGd, Almeida

- PYNGd. Epidemiological profile of patients hospitalized at the burned nursery of Beneficent Association of Campo Grande Santa Casa/MS. *Rev Bras Cir Plást.* 2010; 25 (4):. 600-603
12. Aldunate JLCB, Vana LPM, Fontana C, Ferreira MC. Use of dermal matrix and negative pressure dressings for the treatment of contractures in burn patients. *Rev Bras Cir Plást.* 2012; 27 (3):. 369-373
 13. Guerra ACPCdS, Antunes MPdS, Ferreira JPA, Reis GMDd. Lower extremity burns with bone exposure: reconstruction with dermal regeneration template. *Rev Bras Cir Plást.* 2011; 26 (1):. 174-180
 14. Leite Junior DP, Yamamoto AC, Martins ER, Teixeira AF, Hahn RC. Species of *Candida* isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Cuiaba, Mato Grosso, Brazil. *An Bras Dermatol.* 2011; 86 (4):. 675-680
 15. Pilmis B, Puel A, Lortholary O, Lanternier F. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. *Clin Microbiol Infect.* 2016; (16):. 30143-30144
 16. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC. Infection in Burns. *Surg Infect (Larchmt).* 2016; 17 (2):. 250-255
 17. Kim HA, Hyun M, Ryu SY. Catheter-Associated *Rhodotorula mucilaginosa* Fungemia in an Immunocompetent Host. *Infect Chemother.* 2013, 45 (3):. 339-342
 18. Pereira C, Ribeiro S, Lopes V, Mendonca T. *Rhodotorula mucilaginosa* Fungemia and Pleural Tuberculosis in an Immunocompetent Patient: An Uncommon Association. *Mycopathologia.* 2016; 181 (1-2):. 145-149
 19. Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts - A Taxonomic Study.* 4^a ed.; Elsevier Science: 1998
 20. Furlaneto MC, Rota JF, Quesada RM, et al. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44 (5):. 595-599
 21. Montagna MT, Lovero G, Coretti C, et al. In vitro activities of amphotericin B

- deoxycholate and liposomal amphotericin B against 604 clinical yeast isolates. *J Med Microbiol.* 2014; 63 (12):. 1638-1643
22. Lotfi N, Shokohi T, Nouranibaladezaei SZ, Nasrolahi Omran A, Kondori N. High Recovery Rate of Non-albicans *Candida* Species Isolated From Burn Patients With Candidemia in Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015, 8(10):. e22929
23. Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2012
24. Zaas AK, Boyce M, Schell W, Lodge BA, Miller JL, Perfect JR. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (11):. 5233-5235
25. Pan Y, Liang Z, Yuan S, Xu J, Wang J, Chen S. A long-term follow-up study of acellular dermal matrix with thin autograft in burns patients. *Ann Plast Surg.* 2011; 67 (4):. 346-351
26. Eggimann P, Pittet D. *Candida* colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive Care Med.* 2014; 40 (10):. 1429-1448
27. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3 (11):. 685-702
28. Amaya-Villar R. Invasive candidiasis in severely ill burned patients. *Rev Iberoam Micol.* 2012; 29 (2):. 93-96 [in Spanish]
29. Ha JF, Italiano CM, Heath CH, Shih S, Rea S, Wood FM. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. *Burns.* 2011; 37 (2):. 181-195
30. Puig-Asensio M, Fernandez-Ruiz M, Aguado JM, et al. Role of initial antifungal therapy in the outcome of *Candida glabrata* bloodstream infections: A propensity-score analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60 (6):. 3291-3300
31. Giovannini J, Lee R, Zhang SX, Jun AS, Bower KS. *Rhodotorula* keratitis: a rarely encountered ocular pathogen. In *Case Rep Ophthalmol.* 2014; 5 (3):. 302–310

32. Menon S, Gupta HR, Sequeira R, et al. *Rhodotorula glutinis* meningitis: a case report and review of literature. *Mycoses*. 2014; 57 (7):. 447-451
33. Simon MS, Somersan S, Singh HK, et al. Endocarditis caused by *Rhodotorula* infection. *J Clin Microbiol*. 2014; 52 (1):. 374-378
34. Loss SH, Antonio AC, Roehrig C, Castro PS, Maccari JG. Meningitis and infective endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in an immunocompetent patient. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011; 23 (4):. 507-509
35. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Executive Summary: Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016; 62 (4):. 409-417
36. Savastano C, de Oliveira Silva E, Goncalves LL, Nery JM, Silva NC, Dias AL. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. *Braz J Microbiol*. 2016; 47 (2):. 367-372
37. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. In *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21 (4):. 606-625
38. Pongracz J, Benedek K, Juhasz E, Ivan M, Kristof K. In vitro biofilm production of *Candida* bloodstream isolates: any association with clinical characteristics? *J Med Microbiol*. 2016; 65 (4):. 272-277
39. Trevino-Rangel Rde J, Rodriguez-Sanchez IP, Rosas-Taraco AG, Hernandez-Bello R, Gonzalez JG, Gonzalez GM. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. *Rev Iberoam Micol*. 2015; 32 (3):. 180-184 [in Spanish]

Figures and tables

Table 1. Minimum Inhibitory Concentrations of some antifugals against yeasts isolated from skin lesions.

| Strains | MIC*($\mu\text{g/ml}$) | |
|--|--------------------------|---------|
| | FLZ | AMP-B |
| <i>Candida parapsilosis</i> (H6) | 2 (S) | 0,5 (S) |
| <i>Candida glabrata</i> (H27) | 8 (S) | 1 (S) |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (Rh9708) | 64 (R) | 0,5 (S) |

*MIC (Minimum Inhibitory Concentration) criteria of interpretation (CLSI, 2008): FLZ, fluconazole (S \leq 8; S-DD 16–32; R \geq 64 $\mu\text{g/ml}$); AMP-B, amphotericin B (R $>$ 1 $\mu\text{g/ml}$).

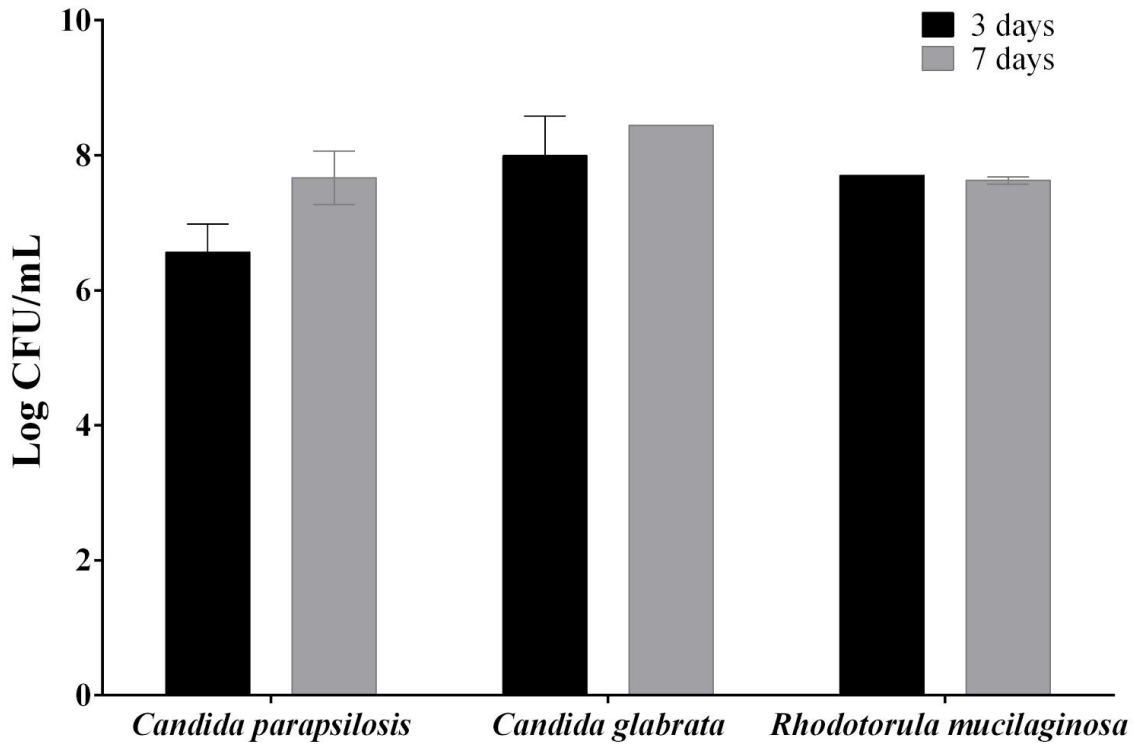


Fig 1. Penetration capacity of *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Rhodotorula mucilaginosa* in Acellular Dermal Matrix in three and seven days. All isolates were able to cross the device within three days. For seven days, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* showed an increase in the number of Colony Forming Units (CFU), while *R. mucilaginosa* remained the same growth. There were no statistical differences between three and seven days.

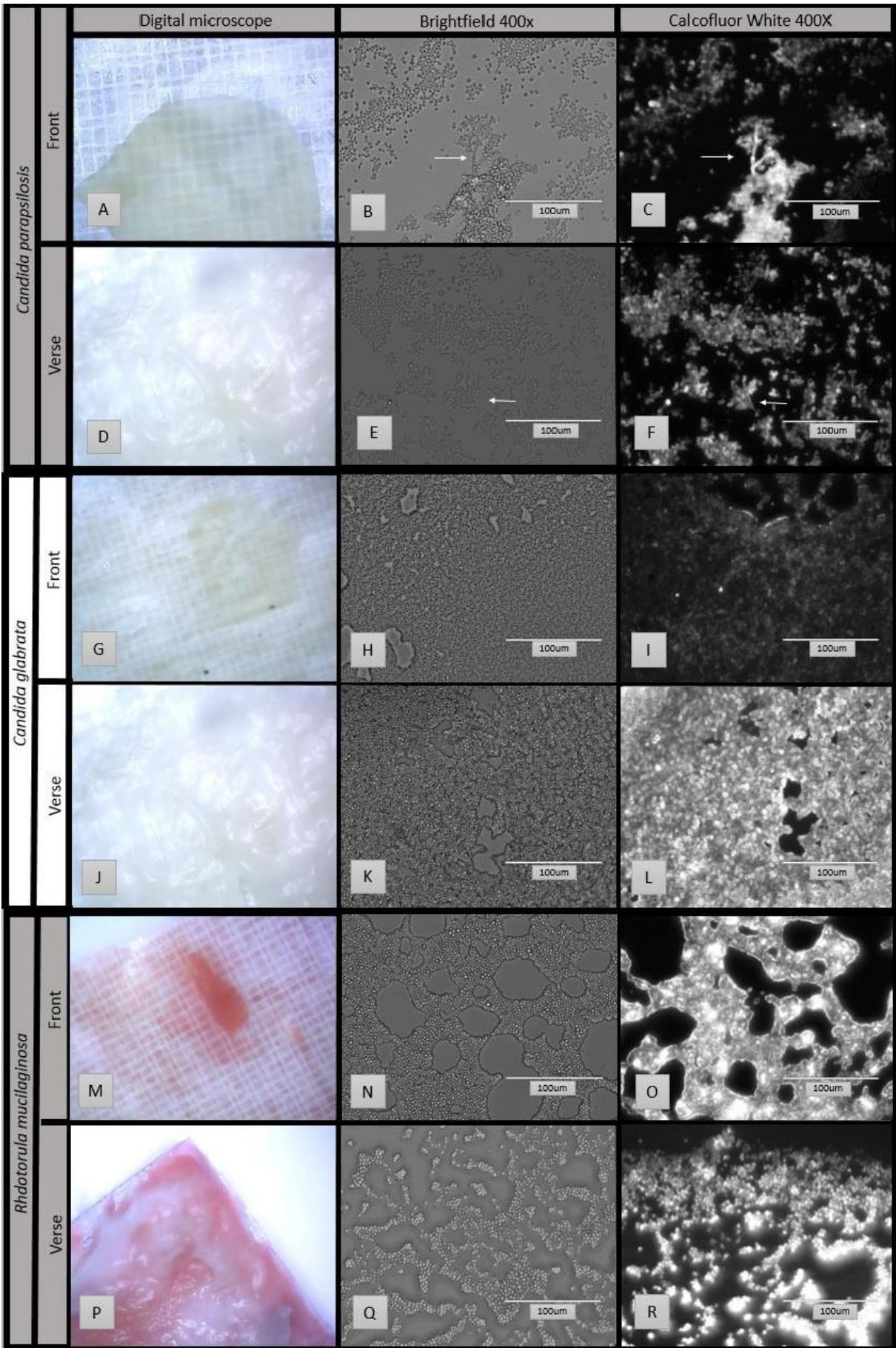
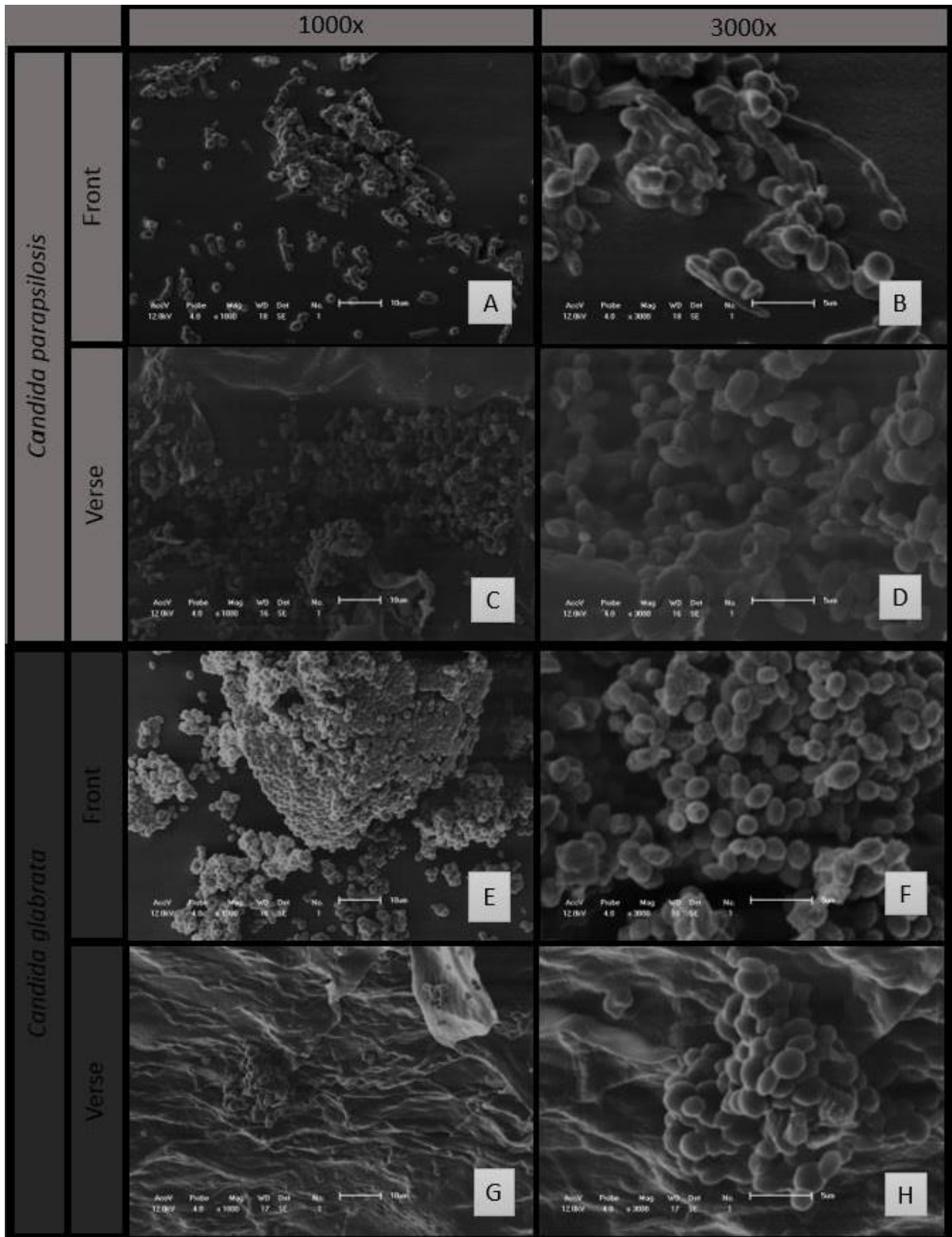


Figure 2: Illustrative photo showing contamination of Artificial Dermis PELNAC (dermal

matrix) with *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Rhodotorula mucilaginosa* in a period of seven days. Figures (A), (D), (G), (J), (M) and (P) are photos taken in a digital microscope 800x (Color CMOS Sensor, Hight Speed DSP). Figures (B), (E), (H), (K), (N) and (Q) are photos taken in brightfield microscope at a magnification of 400x (FL Evos, Live Technologies). Figures (C), (F), (I), (G), (O) and (R) are photos taken in epifluorescence microscope with DAPI light at a magnification of 400x (EVOS FL, Live technologies) in which yeast were stained with calcofluor white. The white arrow shows the filamentation of *C. parapsilosis* (B), (C), (E) and (F).



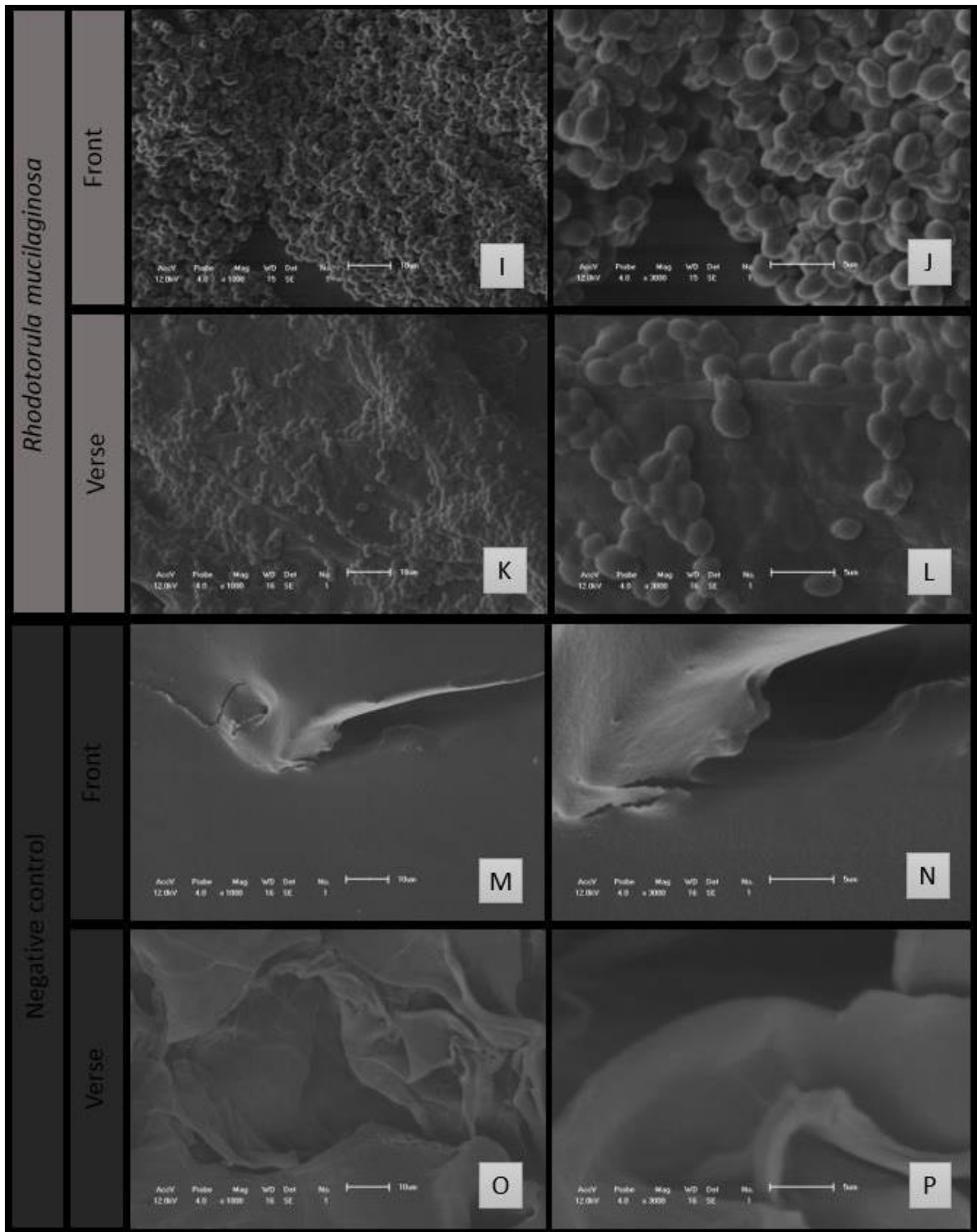


Fig 3. Illustrative photo showing contamination of Artificial Dermis PELNAC (dermal matrix) with *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Rhodotorula mucilaginosa* and negative control in a period of seven days. Figures (A), (C), (E), (G), (I), (K), (M) and (O) are photos taken in a

Shimazu SS-550 Super scan (SHIMADZU, Tokyo, Japan) at magnifications of 1000x. Figures (B), (D), (F), (H), (J), (L), (N) and (P) are photos taken in at a magnification of 3000x.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

O presente trabalho sobre a capacidade de leveduras provenientes da pele em colonizar e migrar para um dispositivo de regeneração da derme mostrou que:

1. Este é o primeiro estudo apresentado sobre a habilidade de migração e colonização de leveduras sapróbias e provenientes da microbiota humana em um dispositivo acelular de regeneração da derme;
2. Todos os isolados apresentaram capacidade de colonizar e migrar para a MDA em 72 horas;
3. *C. glabrata* foi a que apresentou o maior crescimento, tanto em três dias, quanto em sete dias de incubação;
4. *R. mucilaginosa*, o crescimento foi intermediário comparado com os isolados de *Candida* spp., não havendo diferenças entre três e sete dias de incubação;
5. *C. parapsilosis*, entre estas três espécies avaliadas, mostrou o menor crescimento após três dias de incubação, mas em sete dias, houve um aumento substancial em seu crescimento na MDA;
6. Em relação ao teste de sensibilidade, este estudo mostra que todos os isolados foram sensíveis em relação à anfotericina B, sugerindo nenhuma resistência antifúngica, portanto um tratamento eficiente;
7. Para o fluconazol, espécies de *Candida* foram sensíveis, enquanto *R. mucilaginosa* foi resistente à maior concentração testada, como já descrito na literatura;
8. É possível concluir que as leveduras comensais criam um potencial risco para os pacientes graves, tais como aqueles que sofreram algum tipo de queimadura e a MDA proporcionando um ambiente propício ao crescimento de micro-organismos pode levar a septicemia e até mesmo a morte.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Existe a necessidade de estudos adicionais sobre as interações entre a matriz dérmica e leveduras, utilizados nesse estudo, em linhagens celulares como fibroblastos, afim de elucidar o comportamento das leveduras. Podendo ainda ser realizado em tecidos, como restos de pele retirados em cirurgias plásticas, ou mesmo podendo ser reproduzido em modelo *in vivo*.

Entender o comportamento de espécies de *Candida* e *Rhodotorula* na formação de biofilme, que é a chave para o desenvolvimento de medidas preventivas eficazes para infecções por estas leveduras. Estudos adicionais são necessários, sobre a caracterização do biofilme formado sob o dispositivo de regeneração da derme.