



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

**BRUNO NASCIMENTO DA SILVA**

**PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR**  
***TRICHOSPORON* SPP. EM UM HOSPITAL PEDIÁTRICO DE REFERÊNCIA E**  
**BUSCA DE NOVAS ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO**  
**FÚNGICO**

**FORTALEZA**

**2025**

**BRUNO NASCIMENTO DA SILVA**

**PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES CAUSADAS  
POR *TRICHOSPORON* SPP. EM UM HOSPITAL PEDIÁTRICO DE  
REFERÊNCIA E BUSCA DE NOVAS ESTRATÉGIAS DE CONTROLE  
DO CRESCIMENTO FÚNGICO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

**FORTALEZA**

**2025**

---

Página reservada para ficha catalográfica que deve ser confeccionada após apresentação e alterações sugeridas pela banca examinadora.

Para solicitar a ficha catalográfica de seu trabalho, acesse o site: [www.biblioteca.ufc.br](http://www.biblioteca.ufc.br), clique no banner Catalogação na Publicação (Solicitação de ficha catalográfica)

---

**BRUNO NASCIMENTO DA SILVA**

**PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES CAUSADAS  
POR *TRICHOSPORON* SPP. EM UM HOSPITAL PEDIÁTRICO DE  
REFERÊNCIA E BUSCA DE NOVAS ESTRATÉGIAS DE CONTROLE  
DO CRESCIMENTO FÚNGICO**

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Debora Castelo Branco de Souza Collares Maia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Julliana Ribeiro Alves dos Santos  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Profa. Dra. Rachel Basques Caligiorne  
Universidade Federal do Ceará (Santa Casa BH)

---

Profa. Delia Jessica Astete Medrano  
Universidade Federal do Ceará (UNFV)

A Deus, por sempre reafirmar seu amor e cuidado, sendo minha rocha, fortaleza em todos os momentos da vida.

Aos meus pais e avós.

A todos(as) que através dos estudos rompem paradigmas sociais.

## AGRADECIMENTOS

Considerando minha origem, reconheço que hoje rompo paradigmas ao alcançar uma etapa acadêmica que, por muito tempo, me pareceu distante, em grande parte devido a fatores como as limitações econômicas. Permito-me, neste momento, compartilhar brevemente a história do primeiro filho de Marineuda e Júnior, o primeiro neto de Eliane e Evaldo — com muito orgulho, diga-se de passagem — que, mesmo com recursos escassos, deixou sua cidade natal aos 16 anos em busca de formação, movido pelo desejo de transformar a realidade de sua família. Aos 20 anos, de forma despretensiosa e com poucos recursos, tentou o mestrado em Fortaleza, e aos 22, iniciou o doutorado. Ao longo desse percurso, a distância impôs o sacrifício da ausência em momentos significativos da família, e só restava saudade. Por vezes, as lágrimas foram inevitáveis, mas sempre acompanhadas da convicção de que cada renúncia fazia parte de um propósito maior. Não se pode negar, houve dias difíceis, em que a vontade de desistir se fazia presente, marcados pela solidão e pela saudade. Ainda assim, desistir jamais foi uma opção. A resiliência e a fé no propósito me sustentaram. Hoje, ao olhar para essa caminhada, sinto meu coração repleto de orgulho e gratidão.

A Deus, fonte inesgotável de força e sabedoria, expresso minha mais profunda gratidão. Em sua infinita bondade, nunca me faltou amparo, guiando-me com firmeza em cada etapa deste percurso. Reconheço, que sem sua presença constante, esta conquista não teria sido possível, em cada mínimo detalhe, via e vejo, a mão de Deus.

Aos meus pais e avós, expresso minha mais profunda gratidão por serem minha fortaleza e meu porto seguro. Agradeço pelo apoio incondicional, pela constante torcida, pelo amparo em todos os momentos, por investirem com tanto zelo em minha trajetória profissional e, sobretudo, por acreditarem na concretização deste sonho, este trabalho também é de vocês.

Mãe, este resultado é fruto de cada renúncia sua, sacrifício, esforço e investimento realizados por ti em prol da minha educação. Olha só, deu tudo certo. Mais do que isso, é reflexo dos valores que me foram transmitidos desde cedo. Cada conquista minha carrega a tua marca — e, ousou dizer, tua oração. Obrigado e desculpa, por todas as vezes em que faltou algo para ti, por priorizar a mim, você é meu maior exemplo de força e resiliência. Espero hoje estar sendo seu motivo de orgulho, te amo incondicionalmente.

Pai, mesmo até hoje você não entendendo nada do que eu faço rrsrrsrs, sempre permanece na torcida e se orgulhando de cada conquista.

Queridos avós, hoje compartilho com vocês o resultado de cada salgado vendido para custear meus estudos, de cada noite em claro em que a senhora, vó, esperava meu retorno da faculdade, e de cada madrugada em que o senhor, vô, permanecia acordado trabalhando, garantindo assim que no dia seguinte eu tivesse condições de continuar minha jornada acadêmica. Vocês são, e sempre serão, minha maior motivação para seguir em frente. A vocês devo a minha vida, pois desde o meu primeiro dia de vida e até hoje cuidam tão bem de mim, reconheço que nenhum gesto será capaz de retribuir, à altura, todos os sacrifícios feitos, hoje o neto de vocês torna-se doutor.

Às minhas irmãs, Brena Maria, Maria Cecília e Márcia Vitória, obrigado pelo apoio de sempre, por ficarem felizes a cada conquista e por serem também meus incentivos a seguir diante, amo vocês.

Agradeço-lhes por manterem os pés firmes no chão para que eu pudesse voar, mas, acima de tudo, obrigado por me mostrarem, constantemente, que por mais longe que eu vá e por mais desafiador que tudo pareça — sempre terei um lar ao qual retornar, isso me mantém sempre confiante, amo vocês.

A todos meus amigos, os quais realmente posso chamar de amigos, por todas as energias positivas emanadas a mim. Obrigado a todos que direta e indiretamente sempre torceram e de alegraram com minhas conquistas.

Na bíblia o livro de Eclesiastes capítulo 6, versículo 14 fala que “Um amigo fiel é uma poderosa proteção: quem o achou, descobriu um tesouro” e assim é você para mim Lara Nogueira. Minha amiga, minha irmã. Após exatos treze anos de amizade, sinto a necessidade de expressar o quanto você foi — e continua sendo — uma presença essencial em minha vida, em todos os aspectos possíveis. Ao longo dessa trajetória, compartilhamos momentos inesquecíveis de alegria e risadas, mas também enfrentamos episódios de tristeza, insegurança, desespero e lágrimas. Sua presença constante, sua força e seu apoio incondicional foram fundamentais para que eu conseguisse superar as inúmeras barreiras que surgiram ao longo desse caminho. Como nos lembra Eclesiastes 4:9-10: “É melhor ter companhia do que estar sozinho, porque maior é a recompensa do trabalho de duas pessoas. Se um cair, o outro pode ajudá-lo a levantar-se.” Recordo-me, de quando cogitei pela primeira vez a possibilidade de participar do processo seletivo do

mestrado. Mesmo sem contar com apoio de muitos, você esteve ao meu lado, acreditando em mim, incentivando-me, transmitindo palavras de encorajamento e, sobretudo, emanando uma energia positiva que me fortaleceu. Você representa perfeitamente a essência daquela frase: “Contei para você porque sabia que ficaria feliz por mim.” Essa frase resume, com exatidão, o valor e a autenticidade da amizade que cultivamos. Te amo irmã!

A todos meus inúmeros professores, mestres do saber, vocês foram essenciais para a consolidação de todo o conhecimento que objective até hoje, iniciando no ensino infantil e seguindo pelo fundamental, médio, faculdade e pós-graduação.

De tal modo, destaco a minha professora e orientadora durante esses quase sete anos. Professora Rossana de Aguiar Cordeiro, detentora de tanto saber, sinônimo de inteligência, humildade, humanidade, carisma, educação, empatia e tantas outras qualidades – é isso que lhe torna diferente de tantos outros profissionais – a senhora não se perder como pessoa. Muito obrigado por acreditar naquele garoto de 20 anos que lá em 2018 chegou sem orientador, mas com muita vontade de aprender, obrigado por acreditar na minha capacidade e pela confiança em mim depositada, hoje a senhora também é responsável pela realização desse grande sonho, jamais esquecerei de todos seus gestos generosos para comigo, coisas que vão além de uma orientação acadêmica – você é INCRÍVEL.

A professora Débora Castelo Branco, pessoa na qual tenho total respeito e admiração, teço os mesmos elogios que para minha orientadora, pessoa humana, sempre disposta a ajudar. Obrigado por toda a parceria que possibilitou a finalização desta etapa.

A todos os outros professores do PPGMM que trabalham constantemente para que tantos alunos consigam realizar seus trabalhos.

Aos órgãos de fomento - CAPS, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro que torna possível a existência dos PPG e de estudantes bolsistas.

Permaneço meus agradecimentos a pessoas que desde o mestrado continuamos compartilhando este caminho árduo – Anderson Cunha e Carliane Melgarejo, meus amigos especiais.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioagentes Infecciosos: por cada auxílio que foi essencial para a construção deste trabalho, meu muito obrigado especialmente a Ana

Raquel, Maria Laina, Benaya Sanders, Paulo Henrique, Pedro Paulo, Thayna Vasconcelos, Pedro Manzi e Brendda Miranda – que tanto me acolheram durante cada etapa, vocês foram essenciais para que este trabalho existisse – minha eterna gratidão.

À minha banca de qualificação pelas riquíssimas contribuições e disponibilidade – às professoras: Ana Raquel Colares, Livia Gurguel e Rafhaella Della Guardia.

À minha banca de defesa meu muito obrigado pelo aceite do convite e disponibilidade, as professoras – Débora Castelo Branco, Juliana Ribeiro, Rachel Basques e Delia Jessica.

Por fim, a todos – tantos que não cabem nesta tese – que tive a satisfação de conhecer durante essa jornada, guardo em meu coração com carinho cada pessoa e cada momento compartilhado - desde o mais simples até o mais marcante - cada ajuda recebida, cada palavra dita (que nostalgia rsrs) estes, foram essenciais nos momentos mais solitários e tortuosos que precisei vivenciar, jamais esquecerei.

Foram dias difíceis, repleto de desafios, mas com a força concedida por Deus, venci todos.

**De Capistrano-CE, para o Mundo – Bruno Nascimento da Silva– Doutor em  
Microbiologia Médica pela Universidade Federal do Ceará.**

“É justo que muito custe o que muito vale.”

- Santa Teresa d'Ávila

## RESUMO

As Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) envolvem a contaminação da corrente sanguínea e invasão de tecidos e/ou órgãos estéreis e são consideradas questões de grande relevância em saúde pública devido aos elevados índices de morbi-mortalidade. *Trichosporon* spp. são considerados fungos oportunistas, pois valem-se da disbiose microbiana e do desequilíbrio imunológico do hospedeiro para ocasionar infecções invasivas graves. Neste trabalho foi investigado o perfil clínico e epidemiológico das infecções invasivas por *Trichosporon* spp. bem como - o impacto da inibição das proteínas calcineurina e Hsp90 no crescimento desse patógeno. O estudo epidemiológico contou com 28 isolados de interesse. Foram coletados e apreciados os dados destes pacientes no que diz respeito a: idade, sexo, espécie mais prevalente do gênero, distribuição por unidade hospitalar, motivos do atendimento, uso de dispositivos invasivos, espécimes clínicos dos quais os patógenos foram isolados, uso de antimicrobianos e outras drogas condicionantes, coinfeção e medidas de tratamento – todas estas, associadas ao desfecho clínico (alta ou óbito). As cepas isoladas e selecionadas na etapa prospectiva (n=12) foram estudadas pela capacidade de formar biofilmes e seu perfil de sensibilidade a anfotericina B (AMB), voriconazol (VRZ) e fluconazol (FLZ). A segunda etapa do trabalho diz respeito a inibição de calcineurina pelo uso de Ciclosporina A (CsA), contra células planctônicas e biofilmes de cepas de *Trichosporon* spp. em n=13 já contidas em estoque. Estas, foram formadas na presença de CsA nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL para o estado planctônico e 50 µg/mL e 100 µg/mL para os biofilmes. Consequente, CsA nas mesmas concentrações supracitadas foram associadas aos antifúngicos AMB (10 µg/mL), VRZ (50 µg/mL) e FLZ (64 µg/mL) e submetidas aos mesmos testes. O impacto de CsA na ultraestrutura dos biofilmes foi avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de forma isolada e associada aos antifúngicos. Análises de bioinformática foram realizadas de forma a investigar o potencial antibiofilme ocasionado pela inibição de calcineurina em *T. asahii*. Na inibição de Hsp90 com o uso de Radicol (RAD), as cepas foram submetidas a sensibilidade planctônica e posteriormente estudo com biofilmes maduros (48h) expostos a RAD nas concentrações de 6,25 µg/mL para *T. asahii* e 10 µg/mL para *T. inkin*. Em seguida, as mesmas concentrações de RAD nos biofilmes maduros foram associadas a AMB 4 µg/mL para *T. asahii* e 2 µg/mL para *T. inkin* e VRZ 0,125 µg/mL por mais 24h em contato com o biofilme maduro *in vitro*, na morfologia dos biofilmes por MEV e na virulência pelo modelo de infecção experimental com larvas de *Galleria mellonella*. O estudo epidemiológico mostrou que o público pediátrico mais acometido ao longo dos anos foram os meninos, a maior parte, internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI); portadores de doenças neurológicas e câncer; em uso de diversos dispositivos médicos invasivos, como sondas para alimentação; a maioria das amostras isoladas de urina; uma parte significativa fez uso profilático de antimicrobianos; as taxas de mortalidade são consideráveis; as espécie mais prevalente é de *T. asahii*; as cepas obtidas são capazes de formar biofilmes. CsA e RAD isolados e em associação a antifúngicos são capazes de inibir o crescimento fúngico de *T. inkin* e *T. asahii in vitro* e alterar significativamente a ultraestrutura dos biofilmes. RAD consegue ser eficaz no tratamento de larvas de *G. mellonella* infectadas. Estes resultados sugerem novos e promissores alvos terapêuticos para as trichosporonose invasiva, levando em consideração a dificuldade e resistência no tratamento dessas infecções.

**Palavras-chave:** Infecções Fúngicas Invasivas; Ciclosporina A; Radicol; Biofilmes; *Galleria mellonella*.

## ABSTRACT

Invasive Fungal Infections (IFIs) involve contamination of the bloodstream and invasion of sterile tissues and/or organs and are considered issues of great relevance in public health due to the high morbidity and mortality rates. They are considered opportunistic fungi, as they take advantage of microbial dysbiosis and host immune imbalance to cause serious invasive infections. This study investigated the clinical and epidemiological profile of invasive infections by *Trichosporon* spp., as well as the impact of inhibition of calcineurin and Hsp90 proteins on fungal growth of this pathogen. The epidemiological study included 28 isolates of interest. Data on these patients were collected and assessed regarding: age, sex, most prevalent species of the genus, distribution by hospital unit, reasons for treatment, use of invasive devices, clinical specimens from which the pathogens were isolated, use of antimicrobials and other conditioning drugs, coinfection and treatment measures – all of which were associated with the clinical outcome (discharge or death). The strains isolated and selected in the prospective stage (n=12) were studied for their ability to form biofilms and their sensitivity profile to amphotericin B (AMB), voriconazole (VRZ) and fluconazole (FLZ). The second stage of the study concerned the inhibition of calcineurin by the use of Cyclosporine A (CsA) in planktonic cells and biofilms of *Trichosporon* spp. strains in n=13 already contained in stock. These were formed in the presence of CsA at concentrations of 25 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL for the planktonic state and 50 µg/mL and 100 µg/mL for biofilms. Consequently, CsA at the same concentrations mentioned above were associated with the antifungals AMB (10 µg/mL), VRZ (50 µg/mL) and FLZ (64 µg/mL) and subjected to the same tests. The impact of CsA on the ultrastructure of biofilms was evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM) alone and associated with the antifungals. Bioinformatics analyses were performed in order to investigate the antibiofilm potential caused by calcineurin inhibition in *T. asahii*. In the inhibition of Hsp90 using Radicicol (RAD), the strains were subjected to planktonic sensitivity and subsequently studied with mature biofilms (48h) exposed to RAD at concentrations of 6.25 µg/mL for *T. asahii* and 10 µg/mL for *T. inkin*. Then, the same concentrations of RAD in the mature biofilms were associated with AMB 4 µg/mL for *T. asahii* and 2 µg/mL for *T. inkin* and VRZ 0.125 µg/mL for another 24h in contact with the mature biofilm in vitro, in the morphology of the biofilms by SEM and in the virulence by the experimental infection model with *Galleria mellonella* larvae. The epidemiological study showed that the most affected pediatric population over the years were boys, most of them admitted to Intensive Care Units (ICU); carriers of neurological diseases and cancer; using various invasive medical devices, such as feeding tubes; most of the isolated urine samples; a significant proportion used prophylactic antimicrobials; mortality rates are considerable; the most prevalent species is *T. asahii*; the strains obtained are capable of forming biofilms. CsA and RAD, isolated and in combination with antifungals, are capable of inhibiting the fungal growth of *T. inkin* and *T. asahii* in vitro and significantly altering the ultrastructure of biofilms. RAD is effective in the treatment of infected *G. mellonella* larvae. These results suggest new and promising therapeutic targets for invasive Trichosporonosis, taking into account the difficulty and resistance in treatment

**Keywords:** Invasive Fungal Infections; Cyclosporine A; Radicicol; Biofilms; *Galleria mellonella*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Aspectos históricos da identificação e taxonomia de espécies de <i>Trichosporon</i> ao longo dos anos.....	30
<b>Figura 2.</b>	Estruturas microscópicas de <i>Trichosporon</i> spp.....	32
<b>Figura 3.</b>	Fatores de virulência associados à <i>Trichosporon</i> spp., principalmente <i>T. asahii</i> , para promover a penetração no tecido e desenvolver infecção.....	34
<b>Figura 4.</b>	Estágios de desenvolvimento do biofilme.....	37
<b>Figura 5.</b>	Macro e micromorfologia de <i>Trichosporon</i> spp.....	41
<b>Figura 6.</b>	Estrutura química da CsA.....	44
<b>Figura 7.</b>	Estrutura química do radicicol e sítio alvo de ligação à Hsp90.....	47
<b>Figura 8.</b>	Organograma representativo das etapas metodológicas deste estudo...	51
<b>Figura 9.</b>	Panorama dos exames (de 07/08/2012 a 05/10/2023) .....	65
<b>Figura 10.</b>	Capacidade de formação de biofilmes das cepas de <i>T. asahii</i> utilizadas neste estudo.....	79
<b>Figura 11.</b>	Capacidade de formação dos biofilmes de <i>T. inkin</i> e <i>T. asahii</i> .....	81
<b>Figura 12.</b>	Efeito da CsA na biomassa e atividade metabólica em <i>T. inkin</i> e <i>T. asahii</i> .....	83
<b>Figura 13.</b>	Efeito da ciclosporina A (CsA) na suscetibilidade de biofilmes de <i>T. inkin</i> a antifúngicos.....	84
<b>Figura 14.</b>	Efeito da ciclosporina A (CsA) na suscetibilidade de biofilmes de <i>T. asahii</i> a antifúngicos.....	85
<b>Figura 15.</b>	Efeito da CsA e antifúngicos em biofilmes de <i>T. inkin</i> por imagens de MEV.....	86
<b>Figura 16.</b>	Efeito da CsA e antifúngicos em biofilmes de <i>T. asahii</i> por imagens de MEV.....	87
<b>Figura 17.</b>	Estrutura cristalina da calcineurina humana complexada com Ciclosporina A (CsA) e ciclofilina.....	89
<b>Figura 18.</b>	Simulação de encaixe proteína-peptídeo de CsA e calcineurina em <i>T. asahii</i> . Um complexo resultante de ensaios de encaixe molecular DockThor entre a subunidade A de calcineurina prevista em <i>T. asahii</i> e CsA em sua conformação nativa.....	90
<b>Figura 19.</b>	Efeito da inibição de Hsp90 na atividade metabólica e biomassa dos biofilmes de <i>T. inkin</i> e <i>T. asahii</i> .....	93
<b>Figura 20.</b>	Efeito da inibição de Hsp90 na suscetibilidade de biofilmes de <i>T. inkin</i> e <i>T. asahii</i> a RAD e AMB.....	94
<b>Figura 21.</b>	Efeito da inibição de Hsp90 na suscetibilidade de biofilmes de <i>T. inkin</i> e <i>T. asahii</i> a RAD e VRZ.....	96

<b>Figura 22.</b>	Efeito do RAD e antifúngicos em biofilmes de <i>T. inkin</i> por imagens de MEV	97
<b>Figura 23.</b>	Efeito do RAD e antifúngicos em biofilmes de <i>T. asahii</i> por imagens de MEV	98
<b>Figura 24.</b>	Percentual de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>T. inkin</i>	99
<b>Figura 25.</b>	Percentual de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>T. asahii</i>	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Identificação e origem de isolamento das cepas de <i>Trichosporon</i> spp.....	59
<b>Tabela 2.</b>	Idade dos pacientes da pesquisa.....	67
<b>Tabela 3.</b>	Distribuição dos espécimes clínicos dos isolados de interesse por unidade hospitalar.....	68
<b>Tabela 4.</b>	Motivos dos atendimentos.....	69
<b>Tabela 5.</b>	Dispositivos médicos utilizados até a data do isolado de interesse.....	70
<b>Tabela 6.</b>	Espécimes clínicos positivos ao isolamento de <i>T. asahii</i> .....	71
<b>Tabela 7.</b>	Uso de Antimicrobianos e outras classes condicionantes.....	71
<b>Tabela 8.</b>	Desfecho com base no uso dos antimicrobianos.....	72
<b>Tabela 9.</b>	Detecção concomitante de <i>T. asahii</i> e outros microrganismos.....	74
<b>Tabela 10.</b>	Tipos de medidas de intervenção/tratamento.....	75
<b>Tabela 11.</b>	Medicações utilizadas no tratamento e desfecho clínico.....	76
<b>Tabela 12.</b>	Desfecho dos pacientes do estudo por droga(s) durante o tratamento.....	77
<b>Tabela 13.</b>	Identificação presuntiva das cepas de <i>Trichosporon asahii</i> por VITEK®.....	78
<b>Tabela 14.</b>	Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória do Biofilme (CIMB) de <i>AMB</i> , <i>VRZ</i> e <i>FLZ</i> em isolados clínicos de <i>T. asahii</i> (n=12) .....	80
<b>Tabela 15.</b>	Descrição das principais energias de interação obtidas após simulações de acoplamento molecular usando o servidor DockThor.....	91
<b>Tabela 16.</b>	Concentrações inibitória mínimas referente aos testes de sensibilidade planctônica em <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> . .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CsA	Ciclosporina A
DMSO	Dimetilsulfóxido
FLZ	Fluconazol
GXM	Glucoronoxilomanana
IFIs	Infecções Fúngicas Invasivas
IGS	<i>Intergenic Spaces</i>
ITS	<i>Internal Transcriber Spacer</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
RAD	Radicicol
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
VRZ	Voriconazol
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
KOH	Hidróxido de potássio
DO	Densidade óptica
PDB	<i>Protein data bank</i>
CVC	Cateter Venoso Central
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Infecções Fúngicas Invasivas.....	23
2.1.1	<i>Histórico e epidemiologia das infecções fúngicas por Trichosporon spp.</i> .....	25
2.2	Fungos do Gênero <i>Trichosporon</i> .....	26
2.2.1	<i>Histórico</i> .....	26
2.2.2	<i>Generalidades</i> .....	28
2.2.3	<i>Fatores de Virulência</i> .....	31
2.3	Diagnóstico.....	36
2.4	Tratamento.....	40
2.5	Novos alvos terapêuticos em <i>Trichosporon spp</i> .....	42
2.5.1	<i>Ciclosporina A: Inibidor de Calcineurina</i> .....	42
2.5.2	<i>Radicicol: Inibidor de Hsp90</i> .....	45
3	HIPÓTESES.....	48
4	OBJETIVOS.....	49
4.1	Objetivo Geral.....	49
4.2	Objetivos Específicos.....	49
5	METODOLOGIA.....	50
5.1	Desenho experimental.....	50
5.2	1ª parte experimental – Estudo epidemiológico.....	52
5.2.1	<i>Local do estudo</i> .....	52
5.2.2	<i>Modelo da Pesquisa</i> .....	52
5.2.3	<i>Aspectos éticos</i> .....	52
5.2.4	<i>Coleta de dados clínicos e epidemiológicos</i> .....	53
5.2.5	<i>Critérios de inclusão e exclusão de amostras</i> .....	53
5.2.5.1	<i>Critérios de inclusão</i> .....	53
5.2.5.2	<i>Critérios de exclusão</i> .....	53
5.2.6	<i>Definições</i> .....	53
5.2.7	<i>Procedimento laboratorial</i> .....	53
5.2.8	<i>Análise laboratorial</i> .....	54
5.2.8.1	<i>Seleção e tratamento dos isolados de interesse</i> .....	54
5.2.9	<i>Microrganismos</i> .....	54
5.2.10	<i>Capacidade de formação dos biofilmes</i> .....	55
5.2.11	<i>Drogas utilizadas</i> .....	55
5.2.12	<i>Sensibilidade planctônica</i> .....	55

5.2.13	<i>Sensibilidade dos biofilmes.....</i>	55
5.2.14	<i>Análises estatística.....</i>	57
5.3	<b>2ª Parte experimental – Inibição de Calcineurina.....</b>	58
5.3.1	<i>Microrganismos.....</i>	58
5.3.2	<i>Drogas utilizadas.....</i>	58
5.3.3	<i>Efeito da CsA em células planctônicas de Trichosporon spp.....</i>	60
5.3.4	<i>Formação dos biofilmes.....</i>	60
5.3.5	<i>Efeito da CsA na biomassa do biofilme e atividade metabólica.....</i>	60
5.3.6	<i>Efeito da CsA na tolerância de biofilmes a drogas antifúngicas.....</i>	60
5.3.7	<i>Efeito da CsA na ultraestrutura dos biofilmes.....</i>	60
5.3.8	<i>Análises in silico.....</i>	61
5.3.8.1	<i>Busca em banco de dados.....</i>	61
5.3.8.2	<i>Modelagem molecular.....</i>	61
5.3.8.3	<i>Estudos de Docking Molecular.....</i>	62
5.3.9	<i>Análise estatística.....</i>	62
5.4	<b>3ª parte experimental – Inibição de Hsp90.....</b>	63
5.4.1	<i>Microrganismos.....</i>	63
5.4.2	<i>Drogas utilizadas.....</i>	63
5.4.3	<i>Suscetibilidade planctônica à Radicol.....</i>	63
5.4.4	<i>Efeito da inibição de Hsp90 em biofilme maduro.....</i>	63
5.4.5	<i>Efeito da inibição de Hsp90 na tolerância do biofilme a drogas antifúngicas.....</i>	63
5.4.6	<i>Efeito da inibição de Hsp90 em Trichosporon spp e tempo de morte de G. mellonella.....</i>	64
5.4.7	<i>Efeito de RAD na ultraestrutura dos biofilmes.....</i>	64
5.4.7	<i>Análise Estatística.....</i>	64
6	<b>RESULTADOS.....</b>	66
6.1	<b>1ª parte experimental – estudo epidemiológico.....</b>	66
6.1.1	<i>Panorama dos exames.....</i>	66
6.1.2	<i>Divisão do estudo.....</i>	67
6.1.3	<i>Distribuição sociodemográfica.....</i>	67
6.1.4	<i>Distribuição por unidade hospitalar.....</i>	68
6.1.5	<i>Motivos dos atendimentos.....</i>	69
6.1.6	<i>Uso de dispositivos médicos invasivos até a detecção do isolado de interesse.....</i>	70
6.1.7	<i>Isolados a partir dos espécimes clínicos.....</i>	71
6.1.8	<i>Uso de antimicrobianos e outras classes condicionantes de interesse.....</i>	72
6.1.9	<i>Coinfecção.....</i>	74
6.1.10	<i>Medidas de intervenção/tratamento.....</i>	76
6.1.11	<i>Compilado do desfecho clínico dos pacientes.....</i>	78
6.1.12	<i>Caracterização dos isolados da pesquisa.....</i>	79
6.1.13	<i>Formação dos biofilmes.....</i>	79
6.1.14	<i>Determinação de concentração inibitória mínima.....</i>	80
6.2	<b>2ª parte experimental – inibição de calcineurina.....</b>	82
6.2.1	<i>Formação dos biofilmes.....</i>	82
6.2.2	<i>CsA em células planctônicas.....</i>	82
6.2.3	<i>CsA reduz biomassa e atividade metabólica de biofilmes de T. asahii e T. inkin.....</i>	83

6.2.4	<i>Biofilmes formados com CsA aumentam a suscetibilidade de biofilmes de T. inkin a antifúngicos.....</i>	84
6.2.5	<i>Biofilmes formados com CsA aumentam a suscetibilidade de biofilmes de T. asahii a antifúngicos.....</i>	85
6.2.6	<i>CsA colapsou a ultraestrutura dos biofilmes de T. inkin e T. asahii.....</i>	86
6.2.7	<i>Análises in silico.....</i>	89
6.2.7.1	<i>Consulta de banco de dados.....</i>	89
6.2.7.2	<i>Modelagem molecular e simulações de encaixe.....</i>	89
6.3	<i>3ª parte experimental – inibição de Hsp90.....</i>	93
6.3.1	<i>Teste de sensibilidade de RAD em células planctônicas.....</i>	93
6.3.2	<i>Inibição de Hsp90 reduz a atividade metabólica e biomassa dos biofilmes maduros de T. asahii e T. inkin..</i>	94
6.3.3	<i>Inibição de Hsp90 aumenta a susceptibilidade de AMB frente aos biofilmes maduros de T. asahii e T. inkin.....</i>	94
6.3.4	<i>Inibição de Hsp90 aumenta a susceptibilidade de VRZ frente aos biofilmes maduros de T. asahii e T. inkin.....</i>	96
6.3.5	<i>RAD alterou a ultraestrutura dos biofilmes de T. inkin e T. asahii.....</i>	97
6.3.6	<i>Inibição de Hsp90 aumenta a sobrevivência de G. mellonella.....</i>	100
7	<b>DISCUSSÃO.....</b>	102
8	<b>CONCLUSÕES.....</b>	109
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	110
	<b>ANEXOS.....</b>	126
	Ficha de coleta de dados dos prontuários clínicos.....	126
	Comprovante de publicação - 1º artigo.....	137

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) ocorrem após a invasão da corrente sanguínea e/ou tecidos estéreis (Pagano; Mayor, 2018; Fang et al., 2023), consideradas de grande relevância para a saúde pública devido às suas altas taxas de letalidade (Webb et al., 2018; Kimura et al., 2022; Santos et al., 2022). Estima-se que essas infecções sejam responsáveis por mais de 1,5 milhão de mortes anualmente em todo o mundo (Bongomin et al., 2017; Strickland; Shi, 2021).

Esse cenário causa um enorme impacto econômico nos sistemas de saúde globais. Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo do tratamento de IFIs é estimado em cerca de 7,2 bilhões de dólares por ano (Chang et al. 2017; Pappas et al., 2018; Cdc, 2022). No Brasil, infecções fúngicas graves afetaram mais de 3,8 milhões de indivíduos na última década, afetando principalmente aqueles que já apresentam alguma comorbidade, como câncer, transplantados e outras condições imunocomprometedoras (Giacomazzi et al., 2016; Mahmoud et al., 2024). Nessa conjuntura, determinados estudos sugerem aumento da ocorrência da tricosporonose invasiva em diversos países, com taxas de mortalidade de até 90%, a depender da condição clínica do paciente – como a imunossupressão (Girmenia et al., 2005; Liao et al., 2015; Almeida Júnior; Hennequin, 2016; Kreitmann; Blot; Nseir, 2024).

Embora *Candida albicans* ainda seja o patógeno mais importante relacionado às IFIs (Braga et al., 2018; Lass-Flörl et al., 2024), nas últimas décadas outras espécies têm se envolvido cada vez mais (Souza et al., 2022). Entre esses patógenos oportunistas estão *Trichosporon asahii* e *T. inkin* (Nucci; Marr, 2005; Padovan et al., 2019; Fernández-Granda et al., 2025). *Trichosporon* spp. são fungos saprofíticos ambientais que também podem ser encontrados como comensais da microbiota humana respiratória, gastrointestinal e geniturinária (Cho, Matsukura e Sugita, 2015; Eickhoff; Dumm, 2024). São considerados patógenos oportunistas, aproveitando a disbiose e o desequilíbrio imunológico do hospedeiro, para promover infecções graves (Colombo; Padovan; Chaves, 2011; Lima; DIAS, 2024).

*Trichosporon* spp. possuem diversos fatores de virulência que contribuem para o surgimento de infecções invasivas, tais como a capacidade de produção de biofilmes - comunidades microbianas com notável tolerância antifúngica, capazes de suportar concentrações 1000X maiores do que aquelas contra células planctônicas (Girmenia et

al., 2005; Cordeiro et al., 2015; Montoya et al., 2018; Galdiero et al., 2020), a plasticidade metabólica, a termotolerância, a secreção de enzimas líticas, a presença de glucoranoxilomanano (GXM) (Zimbres et al., 2018), o pleomorfismo e a produção de melanina (Duarte-Oliveira et al., 2017; Montoya et al., 2018). Estratégias que miremos nesses fatores de virulência podem ser promissoras para o controle das infecções invasivas.

Diretrizes clínicas recentes recomendam a monoterapia de triazol com voriconazol (VRZ) como primeira escolha para tricosporonose invasiva (Sprute et al., 2022), mas tratamentos baseados em fluconazol (FLZ) ainda são realizados quando o VRZ não está disponível (Chen et al., 2021). No entanto, de acordo com certos especialistas, a resistência ao triazol em *Trichosporon* spp. é um problema emergente e pode estar associada a alta morbidade e mortalidade (Padovan et al., 2019; Ma et al., 2023). Como *Trichosporon* spp. são intrinsecamente resistentes a equinocandinas o arsenal antifúngico para tricosporonose invasiva é muito restrito e a busca por estratégias antifúngicas viáveis é urgente. (Montoya et al., 2018; Arastehfar et al., 2021).

A calcineurina é uma serina-treonina fosfatase conservada da rede de sinalização de cálcio em células eucarióticas (Zhang et al., 2012). Extensas evidências experimentais mostraram que a calcineurina é necessária para a virulência e resistência antifúngica em muitas espécies de fungos (Steinbach et al., 2007; Juvvadi et al., 2017; Zhang et al., 2019). Conseqüentemente, a inibição da calcineurina tem sido considerada uma estratégia promissora contra patógenos importantes, como *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus fumigatus* e *Mucorales* (Zhang et al., 2019).

As proteínas do choque térmico (Hsps) são chaperonas expressas em condições de estresse térmico (Ritossa, 1996; Kampinga et al., 2009; Hartl, Bracher e Hayer-Hartl, 2011). Sabe-se que as Hsps atuam na regulação da morfologia, formação de biofilme e resistência em *Aspergillus fumigatus* (Robbins et al., 2011), *Candida albicans* (Shapiro & Cowen, 2012) e *Histoplasma capsulatum* (Fregonezi et al., 2021), participam da interação parasito-hospedeiro em *Sporothrix schenckii* (García-Carnero et al., 2021) e na redução da virulência no complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/gattii* (Cordeiro et al., 2016) e em *Paracoccidioides* (Cleare, Zamith-Miranda e Nosanchuk, 2017). De tal modo, a inibição das Hsps apresenta-se também como uma estratégia promissora contra patógenos fúngicos, incluindo *Trichosporon* spp.

Dessa forma, destaca-se a importância de se conhecer os aspectos clínicos e epidemiológicos da trichosporonose invasiva em pacientes pediátricos a fim de contribuir com estratégias de controle e investigação da doença, bem como, é necessário a busca por novos alvos terapêuticos para o combate do agente fúngico causador da doença levando-se em consideração o limitado arsenal terapêutico disponível no mercado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Infecções Fúngicas Invasivas

Configuram-se como infecções fúngicas invasivas (IFIs) as que ocorrem após a invasão do patógeno na corrente sanguínea e/ou tecidos estéreis (Pagano; Mayor, 2018; Fang et al., 2023) consideradas de grande relevância para a saúde pública devido às suas altas taxas de letalidade (Webb et al., 2018; Denning, 2024). Durante esse processo, o microrganismo é capaz de superar as defesas naturais do sistema fagocitário do hospedeiro, desencadeando processos infecciosos em diferentes sítios anatômicos, conforme seu tropismo (Pfaller; Castanheira, 2015; Mardani, 2024). A ocorrência das IFIs está associada a diversos fatores externos, como neutropenia febril, uso excessivo e prolongado de antibióticos, nutrição parenteral, negligência às normas de biossegurança por parte dos profissionais de saúde, entre outros (Silva, 2017; Afhami et al., 2024).

Estima-se que essas infecções sejam responsáveis por mais de 1,5 milhão de mortes anuais em todo o mundo (Bongomin et al., 2017; Strickland; Shi, 2021; Mardani, 2024), gerando um impacto econômico significativo nos sistemas de saúde globais. Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo anual do tratamento de infecções fúngicas invasivas (IFIs) é estimado em aproximadamente 7,2 bilhões de dólares (Chang et al., 2017; Pappas et al., 2018; Cdc, 2022). No Brasil, infecções fúngicas graves afetaram mais de 3,8 milhões de pessoas na última década, com maior incidência entre indivíduos com comorbidades preexistentes, como câncer e outras condições que comprometem o sistema imunológico (Giacomazzi et al., 2016; Ruhnke et al., 2018; Afhami et al., 2024).

As IFIs são responsáveis por elevados índices de mortalidade em escala global (Papas et al., 2018; Nichelle; Zimmermann; Brucker, 2019; Preyer et al., 2024), com aproximadamente 1,5 milhão de casos registrados anualmente. Esses números sugerem possíveis falhas no diagnóstico e/ou no tratamento dessas infecções, devido ao limitado arsenal farmacológico e dificuldade no diagnóstico (Campoy e Adrio, 2016; Robbins, Wright e Cowen, 2016; Chang et al., 2017; Hoenigl et al., 2024).

Um estudo de Sanguinetti et al. (2019) destacou a importância do atendimento rápido em pacientes com IFIs, enfatizando os avanços significativos dessa prática nos últimos anos. Entre as técnicas abordadas, os autores ressaltaram o uso da tomografia por

emissão de pósitrons como uma ferramenta valiosa para identificar órgãos possivelmente infectados, como cérebro, pulmões e rins.

Como principais agentes associados as IFIs destacam-se as espécies do gênero *Candida*, (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. auris* (Uppuluri et al., 2010; Ramage et al., 2012; Sanyaolu et al., 2022; Gaetano et al., 2024) as espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp., *Pneumocystis* spp., *Paracoccidioides* spp., *Histoplasma* spp., *Malassezia* spp., *Rhodotorula* spp., e principalmente *Trichosporon* spp. (Esser; Kurzai, 2014; Merseguet et al., 2015; Enoch et al., 2017).

*Trichosporon* spp. são fungos comensais que compõem da microbiota humana e animal com ampla distribuição em diversos ambientes. Primariamente, esses microrganismos ocasionam micoses superficiais, mas certas condições do hospedeiro, como o uso prolongado de antibióticos e a imunossupressão, podem favorecer o desenvolvimento de infecções profundas (Singh et al., 2019; Malacrida et al. 2021).

Desde a década de 1980, *Trichosporon* spp. têm sido a espécie não-*Candida* mais frequentemente isolada em casos de IFIs em pacientes transplantados, ao uso de dispositivos médicos invasivos, recém-nascidos, neoplásicos, diabéticos, indivíduos com neutropenia febril, portadores de HIV/aids, em tratamento quimioterápico ou submetidos ao uso prolongado de corticoides e antibioticoterapia empírica (Gross; Kan, 2008; Almeida Júnior, 2016; Challapilla et al., 2019; Biyun et al., 2024). Nessas populações, a letalidade pode superar 70% (Almeida Júnior; Hennequin, 2016). Devido à gravidade do quadro clínico, as IFIs causadas por *Trichosporon* spp. apresentam prognóstico desfavorável, sendo comuns complicações gerais, destacando-se a falência de múltiplos órgãos, que frequentemente resultam em desfechos fatais (Fagundes-Júnior et al., 2008; Parahym, 2016; Pistori, 2019; Kreitmann; Blot; Nseir, 2024).

Casos infecciosos por *Trichosporon* spp. podem ser relatado também em paciente imunocompetentes com comorbidades associadas, destacando insuficiência cardíaca, diabetes e doença renal (Alp et al., 2020; Papon, Bougnoux, D'enfert, 2020).

No tratamento da tricosporonose invasiva, os triazólicos - [VRZ](#), [FLZ](#), posaconazol (PZC) e itraconazol (ITZ) - são as drogas de escolha, devido à resistência intrínseca de *Trichosporon* spp. às equinocandinas (Mariné et al., 2015b; Almeida Júnior e Hennequin, 2016). No entanto, o agravante de episódios representados por falha terapêutica foi

relatado com o uso de anfotericina B (AMB) (HOY et al., 1986; Girmenia et al., 2005), além da identificação de isolados resistentes a este antifúngico (Chagas-Neto et al., 2009; Suzuki et al., 2010; Atehortua et al., 2017).

### **2.1.1 Histórico e epidemiologia das infecções fúngicas por *Trichosporon* spp.**

Watson e Kallichurum (1970) descreveram o primeiro caso de Trichosporonose invasiva, onde *Trichosporon cutaneum* foi o causador de um abscesso cerebral em uma mulher de 39 anos portadora de um adenocarcinoma de pulmão, evoluindo à óbito após 4 semanas de acometimento.

A partir deste primeiro relato, diversos outros casos passaram a ser documentados na literatura. Em 1974, foi descrito o primeiro caso de *T. cutaneum* em um jovem de 12 anos com leucemia linfocítica (Rivera e Ayten, 1975). Em 1980, Evans e colaboradores registraram dois casos de tricosporonose invasiva, ambos em pacientes com leucemia em tratamento quimioterápico, uso antibióticos e apresentavam febre. Já em 1989, foi relatado o primeiro caso de tricosporonose em um paciente com Aids, sendo este apenas um dos muitos relatos que surgiram até os dias atuais (Leaf e Simberkoff, 1989).

Krcmery Júnior e colaboradores (1999) conduziram um estudo nos Institutos do Câncer St. Elizabeth e observaram que *Trichosporon* spp. foram os fungos não-*Candida* mais frequentemente isolados de pacientes com fungemia. Em outra pesquisa realizada por Cox e Perfect (1997), constatou-se que as disseminações hematológicas geradas por *Trichosporon* spp. continuam a evoluir, mesmo após o tratamento com AMB, um antifúngico com ação fungicida utilizado em infecções disseminadas. Fagundes Júnior et al., (2008) destacam que infecções disseminadas causadas por fungos até então raros, como *Trichosporon* spp., têm se tornado mais comuns. No estudo, os autores relatam o caso de uma paciente idosa com insuficiência cardíaca e hipertensão arterial, internada em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI). A paciente desenvolveu insuficiência renal aguda, respiratória e urinária. Após sete meses de internação, a mesma foi diagnosticada com choque séptico associado a uma infecção urinária causada por *T. asahii*. O tratamento envolveu o uso de AMB, vancomicina e imipenem, mas não houve resposta positiva. Após 18 dias de tratamento, a paciente evoluiu para falência múltipla de órgãos e sucumbiu.

Conseqüentemente, diversos especialistas concentraram seus esforços na investigação de casos de tricosporonose. Um exemplo é a pesquisa realizada por Liao e

seus colegas (2015), que registrou 185 episódios de infecções disseminadas por *Trichosporon spp.*, entre 1975 e 2014, em diversas regiões, como América do Norte, Europa, Ásia e América do Sul. Os estudos identificaram fatores que predispunham os pacientes a essas infecções, tais como: doenças hematológicas, uso de antibióticos, neutropenia, tratamentos quimioterápicos, uso de cateteres, prematuridade em crianças, profilaxia com antifúngicos e administração de corticoides. Desses pacientes, 57,4% apresentam alguma condição hematológica maligna. Em uma pesquisa mais recente, conduzida por Singh e sua equipe (2019) em um hospital no Norte da Índia, foi realizada uma análise detalhada dos casos de infecção por *Trichosporon spp.* ao longo de um período de 12 anos. Os fatores de risco observados foram semelhantes aos do estudo anterior. Verificou-se que a tricosporonose invasiva foi diagnosticada em 62,5% dos casos, sendo que 57,78% dos isolados foram obtidos a partir de amostras sanguíneas, com a espécie predominante sendo *T. asahii* (79,16%). Por fim, os autores destacaram o aumento progressivo da incidência ao longo dos anos.

## **2.2 Fungos do Gênero *Trichosporon***

### **2.2.1 Histórico**

A palavra *Trichosporon* tem origem grega, sendo que "trichos" refere-se à pelos e "sporon" a esporos (Colombo; Padovan; Chaves, 2011). Contudo, a primeira descrição histórica de *Trichosporon spp.* ocorreu em Londres, por Beigel, no ano de 1865. Naquela época, esse microrganismo era encontrado como nódulos brancos aderidos a perucas feitas de cabelo humano. No ano seguinte, em 1866, Ernst Hallier, em homenagem a Beigel, denominou o patógeno de *Sclerotium beigelii*, sendo identificado como um agente fúngico causador da piedra branca (Sidrim; Rocha, 2004; Vazquez, 2010). Em 1867, o micologista e botânico alemão Gottlob Ludwig Rabenhorst isolou um microrganismo de cabelos de peruca e o denominou *Pleurococcus beigelii* (Guého et al., 1992). Posteriormente, em 1870, Gustav Behrend estudou um paciente com piedra branca, no qual o fungo foi encontrado na barba do indivíduo e foi classificado como *Trichosporon ovoides* (Behrend, 1890; Colombo; Padovan; Chaves, 2011).

Ao longo dos anos, surgiram relatos adicionais de espécies pertencentes a este gênero. Em 1902, Vuillemin, ao observar casos de infecções que acometiam os pelos dos bigodes, baseou-se em estudos anteriores para determinar que todas as espécies já

descritas de *Trichosporon* eram variações de uma única espécie, posteriormente denominada *Trichosporon beigeli* (Guého; De Hoog e Smith, 1992).

Mais tarde, em 1910, o micologista e dermatologista Charles Lucien de Beurmann isolou um fungo proveniente de lesões cutâneas, inicialmente chamado de *Oidium cutaneum*. Posteriormente, ele foi renomeado para *Trichosporon cutaneum*, em referência à sua origem em lesões na pele (Beurmann, Gougerot e Vaucher, 1910). A partir dessa nomenclatura, qualquer isolamento de *Trichosporon*, independentemente do sítio de coleta, era classificado como *T. beigeli* ou *T. cutaneum*, sob a premissa de que ambos os nomes eram sinônimos—a percepção predominante por muitos anos (Guého et al., 1994; Colombo; Padovan; Chaves, 2011).

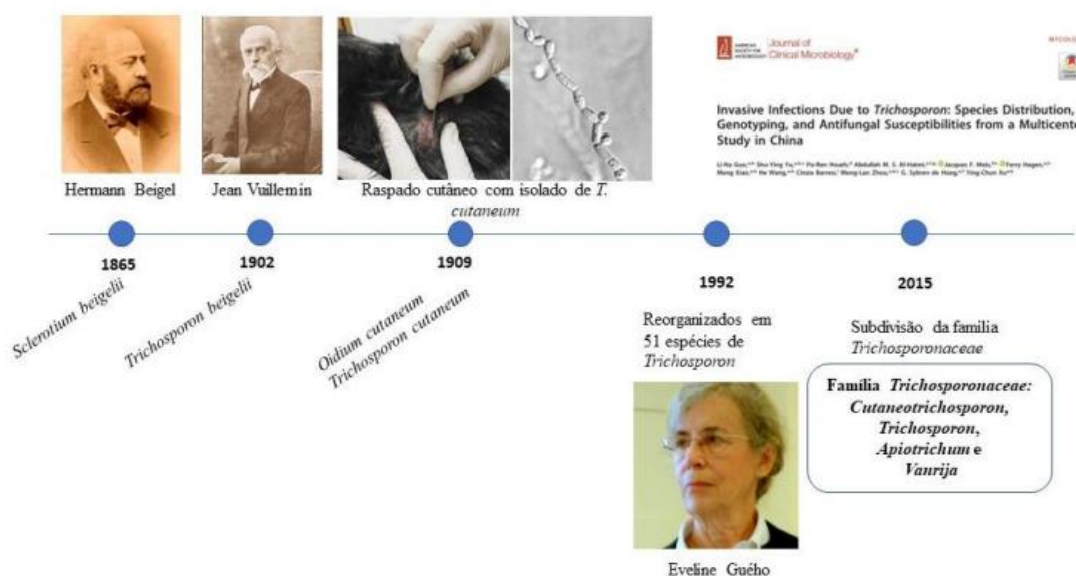
Em 1992, Eveline Guého liderou um grupo de pesquisadores que propôs uma revisão taxonômica abrangente do gênero *Trichosporon*. Utilizando técnicas moleculares avançadas, como reassociação DNA/DNA e sequenciamento parcial de RNA ribossomal 26S, os pesquisadores identificaram muitas espécies pertencentes a esse gênero. Durante esse estudo, a espécie *T. beigeli* foi retirada da classificação oficial (Guého et al., 1992; Mariné et al., 2015b). Entre as novas espécies identificadas, seis destacaram-se por sua relevância patogênica e frequência de isolamento: *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum* e *T. mucoides*, todas capazes de causar doenças em seres humanos (Guého et al., 1994).

Estudos genéticos e moleculares posteriores dividiram o gênero *Trichosporon* em cinco grupos principais (clados): *cutaneum*, *ovoides*, *brassicae*, *gracile* e *porosum*, totalizando 51 espécies, das quais 17 possuem maior relevância clínica. Entre elas estão: *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. mucoides*, *T. dermatitis*, *T. loubieri*, *T. jirovecii*, *T. montevideense*, *T. mycotoxinovorans*, *T. domesticum*, *T. japonicum*, *T. coremiiforme*, *T. dohaense*, *T. lactis* e *T. faecale* (Colombo; Padovan; Chaves, 2011; Taverna, 2014; Mariné et al., 2015).

Em 2015, um estudo conduzido por Liu et al. (2015) revisitou o processo taxonômico desse gênero fúngico e propôs a criação de novos gêneros para os clados monofiléticos já existentes, através de pesquisas fundamentadas nas sequências de rDNA de IGS1 que identificaram quatro gêneros dessa família, os quais foram denominados de *Cutaneotrichosporon*, *Trichosporon*, *Apiotrichum* e *Vanrija*. Certas espécies antes pertencentes ao gênero *Trichosporon* tornam a compor outro gênero da família

*Trichosporonaceae* (Liu et al., 2015; Francisco et al., 2019). Em tempo presente, o gênero *Trichosporon* dividi-se em 12 espécies, sendo *T. asahii*, *T. inkin*, *T. faecale*, *T. ovoides*, *T. mucoides* e *T. asteroides* as clinicamente consideráveis (**Figura 1**) (Liu et al. 2015; de Francisco et al. 2019; Guo et al. 2019; Malacrida et al. 2021)

**Figura 1.** Aspectos históricos da identificação e taxonomia de espécies de *Trichosporon* ao longo dos anos.



**Fonte:** Pereira, 2022.

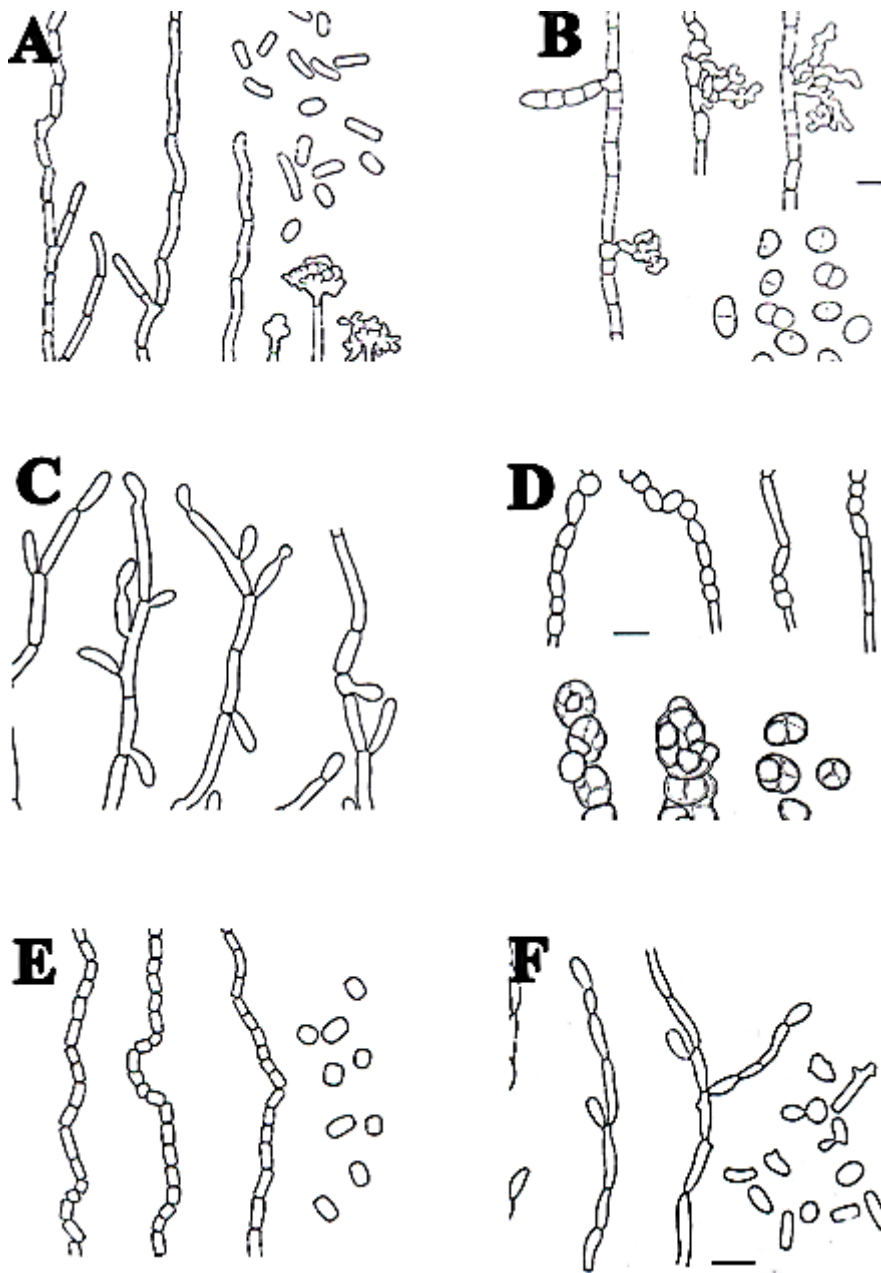
### 2.2.2 Generalidades

Os fungos do gênero *Trichosporon* pertencem ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Tremellomycetes, ordem Trichosporonales e família *Trichosporonaceae* (Taverna et al., 2014). Estes fungos são responsáveis por causar micoses superficiais que acometem os pelos de diferentes áreas, como cabelos, barba, cílios, axilas e regiões íntimas. Geralmente, essas infecções não apresentam reações inflamatórias, sendo frequentemente assintomáticas. As principais queixas dos pacientes estão relacionadas a questões estéticas (Sidrim; Rocha, 2004; Silvestre Junior; Miranda, 2010; Mattede et al., 2015).

Entre as 17 espécies patogênicas associadas a quadros clínicos em ambientes hospitalares, destacam-se *T. asahii*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. mucoides* e *T.*

*ovoides* representada na **figura 2** (Colombo; Padovan; Chaves, 2011). No contexto de infecções sistêmicas, *T. asahii* e *T. mucoides* são particularmente relevantes, especialmente em pacientes imunossuprimidos (Tambe et al., 2009; Inácio, 2015). *T. asahii* é considerada a espécie de maior virulência devido à sua capacidade de invadir a corrente sanguínea, resultando em fungemia e apresentando elevada taxa de letalidade (Lopes, 2018). Estudos epidemiológicos comprovam que *T. inkin* é a segunda espécie mais correlacionada a tricosporonose invasiva, sendo obtida de amostras biológicas como urina, sangue e cateteres (Araújo, Marques, 2010; Almeida Júnior & Hennequin, 2016; Milan et al. 2018).

**Figura 2.** Estruturas microscópicas de *Trichosporon* spp.



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

Os fungos do gênero *Trichosporon* estão amplamente distribuídos na natureza, especialmente em ambientes tropicais e temperados. Podem ser encontrados no solo, na água, em madeiras em decomposição, em excretas de animais, entre outros (Colombo; Padovan; Chaves, 2011). Em seres vivos, fazem parte da microbiota da pele e de mucosas,

como as do trato respiratório superior, sistema gastrointestinal, áreas genitais e perianais (Cho; Matsukura; Sugita, 2015). Apesar de serem predominantemente saprófitas e não invasivas, as espécies de *Trichosporon* podem transitar de uma condição comensal para um estado patogênico em casos de disbiose, tornando-se responsáveis por infecções sistêmicas oportunistas (Guého et al., 1994; Colombo; Padovan; Chaves, 2011).

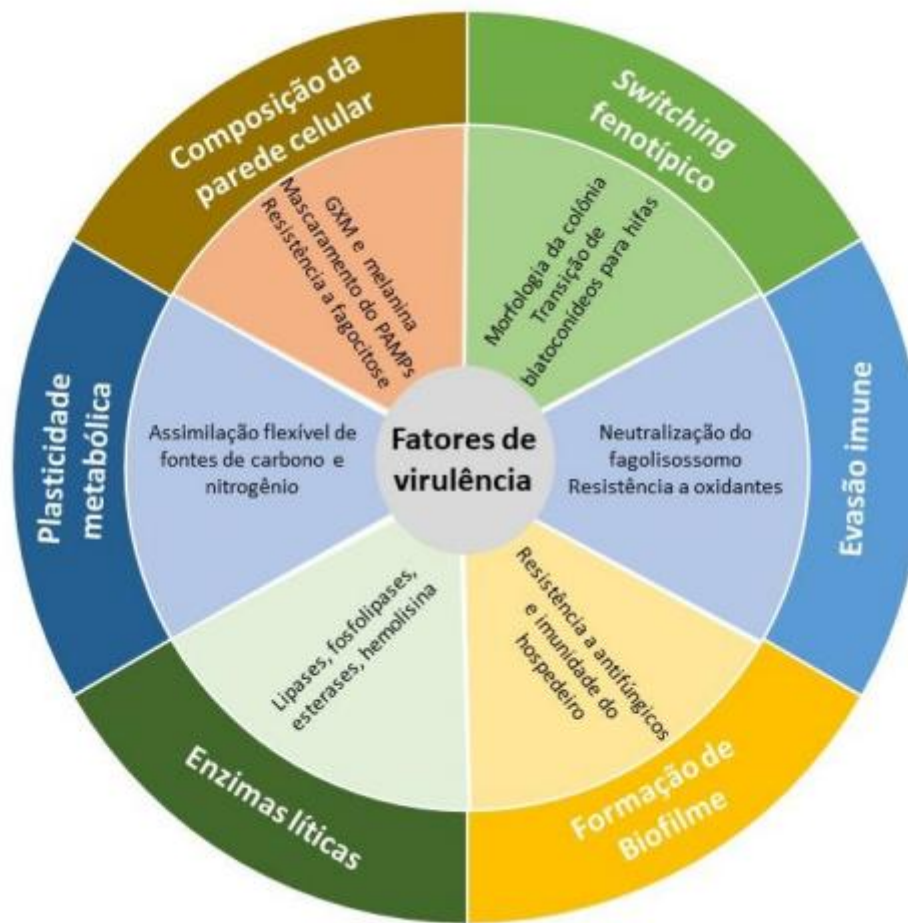
### 2.2.3 Fatores de Virulência

Define-se virulência como o conjunto de fatores manifestos por microrganismos que determinam seu grau de patogenicidade, ou seja, sua capacidade de causar danos ao hospedeiro ao driblar as defesas do sistema imunológico. Esse processo está intrinsecamente relacionado a condições bioquímicas e fisiológicas, além de depender de ambientes e atmosferas propícios para o desenvolvimento do patógeno (Madigan et al., 2010; Bentubo et al., 2014).

As espécies do gênero *Trichosporon* exibem diversos fatores de virulência que, em associação à redução da imunidade do hospedeiro, favorecem o surgimento de infecções por esses microrganismos, incluindo as IFIs. Um importante fator de virulência comprovado é a capacidade de formar biofilmes, estruturas que conferem maior resistência às células fúngicas (Lagree; Mitchell, 2017; Montoya et al., 2018; Galdiero et al., 2020). Além disso, *Trichosporon* produz um polissacarídeo crucial em sua parede celular – o glucoranoxilomanano (GXM) – que possui a destreza em suprimir a resposta imunológica do hospedeiro (Zimbres et al., 2018; Jimenez et al., 2025).

Outros fatores associados à patogenicidade incluem termotolerância, secreção de enzimas extracelulares líticas (Cordeiro et al., 2015; Jimenez et al., 2025), variação fenotípica (*switching* fenotípico), pleomorfismo que permite a formação de hifas, e a produção de melanina - substância que contribui para a proteção contra o ataque imunológico do hospedeiro (**Figura 3**) (Carvalho et al., 2014; Mariné, 2015a; Duarte-Oliveira et al., 2017; Montoya et al., 2018; Alboloshi et al., 2024).

**Figura 3:** Fatores de virulência associados à *Trichosporon* spp., principalmente *T. asahii*, para promover a penetração no tecido e desenvolver infecção.



**Legenda:**

\*GXM – Glucuroxilomanana; PAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno.

**Fonte:** Adaptado de Duarte- Oliveira et al., 2017; Pereira, 2022.

O GXM, um polissacarídeo presente na parede celular de *Trichosporon* spp., é estruturalmente semelhante ao antígeno capsular do gênero *Cryptococcus* spp. Composto por um hexassacarídeo tipo  $\alpha$ 1,3-D-manano substituído por um resíduo de ácido  $\beta$ 1,2-glucopiranosilurônico e seis unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosil (Ichikawa et al., 2001). Esse composto reduz a capacidade fagocítica de células imunes, como neutrófilos e monócitos, facilitando o estabelecimento da infecção. No entanto, os mecanismos detalhados relacionados à patogenicidade e virulência do GXM em *Trichosporon* spp. ainda não são completamente compreendidos (Zimbres et al., 2018).

O episódio de *switching* fenotípico em *Trichosporon* spp. também desempenha um papel essencial na patogênese. Essa permuta fenotípica regula genes como SAP1 e SAP3, que estão associados a propriedades de adesão celular, facilitando a apropriação tecidual e cooperando ao escape do microrganismo das defesas imunológicas do hospedeiro (Ichikawa et al., 2004).

As principais enzimas líticas secretadas por *Trichosporon* spp. incluem proteases, lipases, fosfolipases, DNAses, esterases e hemolisinas. Essas enzimas expressam um papel fundamental na virulência do patógeno, promovendo a degradação de proteínas, lipídios, fosfolipídios, a lise de hemácias e a clivagem de moléculas de DNA. De tal modo, estes processos facilitam a invasão e disseminação do fungo nos tecidos do hospedeiro (Mariné, 2015a; Cordeiro et al., 2015; Montoya et al., 2018; Pillai et al., 2024).

A melanina, um pigmento responsável por tonalidades escuras que variam do preto ao marrom, é produzida por alguns fungos denominados de demáceos e por outros considerados produtores de melanina, como as espécies de *Cryptococcus*, na presença de compostos fenólicos como o L-DOPA (Casadevall et al., 2000; Brilhante et al., 2017). Análises realizadas por Carvalho et al. (2014) confirmaram a produção de melanina por *Trichosporon* spp. quando exposto ao composto L-DOPA. Essa substância exibe papel relevante na patogenicidade, pois acredita-se que esta atue como um mecanismo de resistência aos antifúngicos — ao ser produzida e abrigada na parede celular fúngica, inviabiliza a penetração dos medicamentos. Além disso, a melanina também auxilia na evasão do sistema imunológico, interferindo no processo de opsonização e protegendo o fungo pela ação dos macrófagos.

Outra característica notável em *Trichosporon* spp. diz respeito a sua capacidade de formar biofilmes em diferentes superfícies. Essas estruturas são complexas, robustas e tridimensionais, permitindo a adaptação a condições ambientais adversas. O biofilme é um dos principais fatores de virulência do gênero, pois reduz significativamente a eficácia de medicamentos antifúngicos comumente utilizados na prática clínica, contribuindo para a persistência e gravidade das infecções (Lagree; Mitchell, 2017; Montoya et al., 2018; Galdiero et al., 2020; Silva, 2025).

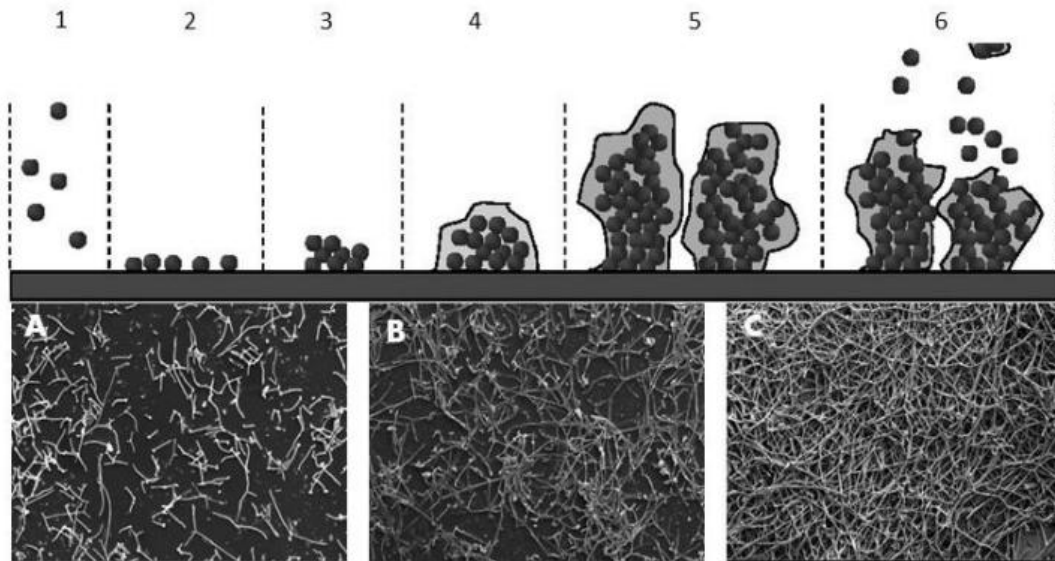
Biofilmes são comunidades microbianas sésseis compostas por milhões de células organizadas altamente complexas e robustas, encapsuladas em uma matriz extracelular polimérica (Fanning; Mitchelle, 2012; Lagree; Mitchell, 2017; Wang et al., 2024). Essas

comunidades detêm a capacidade de aderir-se a superfícies bióticas e abióticas, incluindo dispositivos médicos de grande utilidade na prática clínica, como cateteres, próteses dentárias, implantes, órteses, marcapassos e demais equipamentos hospitalares. Inúmeros microrganismos exibem a capacidade de formar biofilmes, com destaque para fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pneumocystis*, *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, e várias espécies de *Candida*, sendo estes últimos de maior relevância clínica (Montoya et al., 2018; Galdiero et al., 2020). Estima-se que aproximadamente 80% dos microrganismos no ambiente se organizem dessa forma sésil (Donlan, 2002; Flemming et al., 2023).

A formação de biofilmes apresenta um desafio significativo para o tratamento antimicrobiano, pois as células sésseis podem demonstrar resistência até mil vezes superior aos antifúngicos testados, como os azólicos, em comparação às células livres (Fanning; Mitchell, 2012; Iturrieta-González et al., 2014; Sharma et al., 2023). Essa diferença de resistência reflete uma estratégia de sobrevivência dos microrganismos, permitindo-lhes proteção contra estressores ambientais, químicos e físicos. Além disso, os biofilmes induzem mudanças na expressão gênica e conferem características fenotípicas exclusivas, como alterações na morfologia das colônias macroscópicas (Ramage et al., 2009; Kurakado et al., 2021).

O processo de formação dos biofilmes ocorrem com: adesão, caracterizada pela interação eletrostática entre a superfície e as células; desenvolvimento, fase em que a matriz extracelular é sintetizada pelas próprias células por meio da sinalização via *quorum sensing*; maturação, estágio no qual o biofilme se organiza, estabelecendo estruturas definidas, canais de água e um eficiente sistema de distribuição de nutrientes; e, por fim, dispersão, onde fragmentos do biofilme se desprendem para colonizar novas superfícies. (**Figura 4**) (Martins et al., 2010; Pereira et al., 2021; Lara et al., 2023).

**Figura 4.** Estágios de desenvolvimento do biofilme



**Legenda:**

1. Células planctônicas; 2. Fixação reversível a superfície; 3. formação de microcolônias; 4. adesão irreversível com produção de matriz exopolissacarídica (EPS), e começo da comunicação entre as células mediada por moléculas do *Quorum sensing*; 5. biofilme maduro com estrutura típica de cogumelo e 6. a dispersão de células para colonizar novos locais. Em A, B, e C representa microscopia eletrônica de varredura do processo de adesão, maturação e biofilme maduro, respectivamente, de uma cepa de *T. asahii*.  
**Fonte:** Pereira, 2022 (Imagens de MEV).

Fatores como a presença da matriz extracelular polimérica, a complexidade estrutural e a regulação de genes associados a bombas de efluxo contribuem para a resistência (seja intrínseca ou adquirida) dos biofilmes fúngicos. Diferentes gêneros fúngicos apresentam perfis variados de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, o que dificulta ainda mais o tratamento (Fanning; Mitchell, 2012; Mirghani et al., 2022).

Biofilmes são formados por camadas de células com distintas atividades metabólicas. A camada mais profunda, composta por células em estado de dormência, é especialmente resistente a altas concentrações de drogas antimicrobianas (células persistentes). Estudos recentes buscam identificar essas células persistentes, com o objetivo de medir a dependência de dose dos agentes antimicrobianos, considerando a cronicidade de certas infecções. Exemplos incluem testes de sensibilidade planctônica e quantificação de unidades formadoras de colônias em espécies de *Candida*. No entanto, a fisiologia detalhada e as vias envolvidas na indução dessas células persistentes ainda

permanecem pouco compreendidas (Al-Dhaheri; Douglas, 2008; Barth Junior, 2014; Galdiero et al., 2020; Cordeiro et al., 2021; Patel; Buchad; Gajjar, 2022).

### 2.3 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial inicial é realizado por meio da coleta de amostras biológicas, como pelos, unhas, sangue, líquido e outros materiais, dependendo do tipo e local de infecção. Os pelos devem ser examinados macroscopicamente com o auxílio de uma lupa, removidos com uma pinça e enviados ao laboratório para análise subsequente. Antes da cultura, é recomendada a análise direta da amostra utilizando uma solução clarificante de hidróxido de potássio (KOH) a 10-40%, para posterior observação ao microscópio óptico na objetiva de 40x. A análise microscópica deve evidenciar estruturas como hifas, blastoconídios e, principalmente, artroconídios (Sidrim; Rocha, 2004; Somenzi; Ribeiro; Menezes, 2006; Lima; Dias, 2024; Wu, 2025).

Para a coleta de amostras de unhas, utilizam-se materiais como tesouras, alicates ou curetas. O objetivo é remover a parte mais afetada da unha, descartando o excesso de hiperqueratose. Em casos de onicomicoses associadas à paroníquia, recomenda-se também a coleta de secreção purulenta utilizando um *swab* (Sidrim; Rocha, 2004; Somenzi; Ribeiro; Menezes, 2006).

No caso das IFIs, o diagnóstico baseia-se exclusivamente em métodos laboratoriais, já que essas infecções não apresentam sinais ou sintomas específicos. A cultura é considerada o padrão-ouro em infecções superficiais e invasivas por *Trichosporon* spp. Associada à análise microscópica, a identificação de elementos característicos, como artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudohifas, é essencial. No caso de tricosporonoses invasivas, o diagnóstico definitivo inclui hemocultura positiva, sintomas clínicos compatíveis, cultura fúngica positiva do líquido cefalorraquidiano ou biópsia com achados histopatológicos característicos do fungo (Arnon; Litmanovitz, 2008; Colombo; Padovan; Chaves, 2011; Izumi, Hisata e Hazama, 2009; Shabaan et al., 2018).

Quando há suspeita de tricosporonose invasiva, especialmente com sangue como amostra principal, a coleta deve ser realizada preferencialmente antes da administração de antimicrobianos, seguindo rigorosamente os protocolos de biossegurança. Recomenda-se a obtenção de duas amostras de locais distintos. As garrafas de hemocultura devem ser estéreis e adaptadas à idade do paciente: pediátricas ou adultas.

Para adultos, o volume recomendado é de 10-20 mL, distribuídos entre as garrafas coletadas. Em crianças, coleta-se entre 1,0 e 5,0 mL. Após a coleta, as amostras podem ser incubadas em sistemas automatizados, como BACTEC® ou BACT/ALERT®, que detectam positividade por meio da liberação de CO<sub>2</sub> e alterações no pH. Normalmente, amostras contaminadas apresentam resultados positivos nas primeiras 24 horas (Levin, 2007). No método manual, as garrafas devem ser incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por sete dias, com agitação e observação diárias (Cimolai, 2001).

O meio de cultura presente nas garrafas de hemocultura é enriquecido, geralmente, com tripticase-soja, peptona, infusão de cérebro e coração (BHI) e caldo Columbia. Além disso, contém anticoagulantes como heparina e citrato, que preservam a viabilidade do sangue (Koneman et al., 2001).

Em hemoculturas, após a detecção de positividade, é confeccionada uma lâmina utilizando a técnica de GRAM, com o objetivo de observar estruturas predominantemente leveduriformes indicativas do patógeno (Pereira et al., 2009). Adicionalmente, as amostras, independentemente do local de coleta, devem ser cultivadas em uma tríade de meios de cultura: Ágar Sabouraud, Ágar Sabouraud suplementado com cloranfenicol (antibiótico que inibe o crescimento bacteriano) e Ágar Sabouraud contendo cloranfenicol e cicloeximida, conhecido também como Mycosel (que impede o crescimento de bactérias e fungos anemófilos). O crescimento é monitorado por um período de 5 a 7 dias (Cano-Pallares et al., 2016; Ferreira et al., 2019).

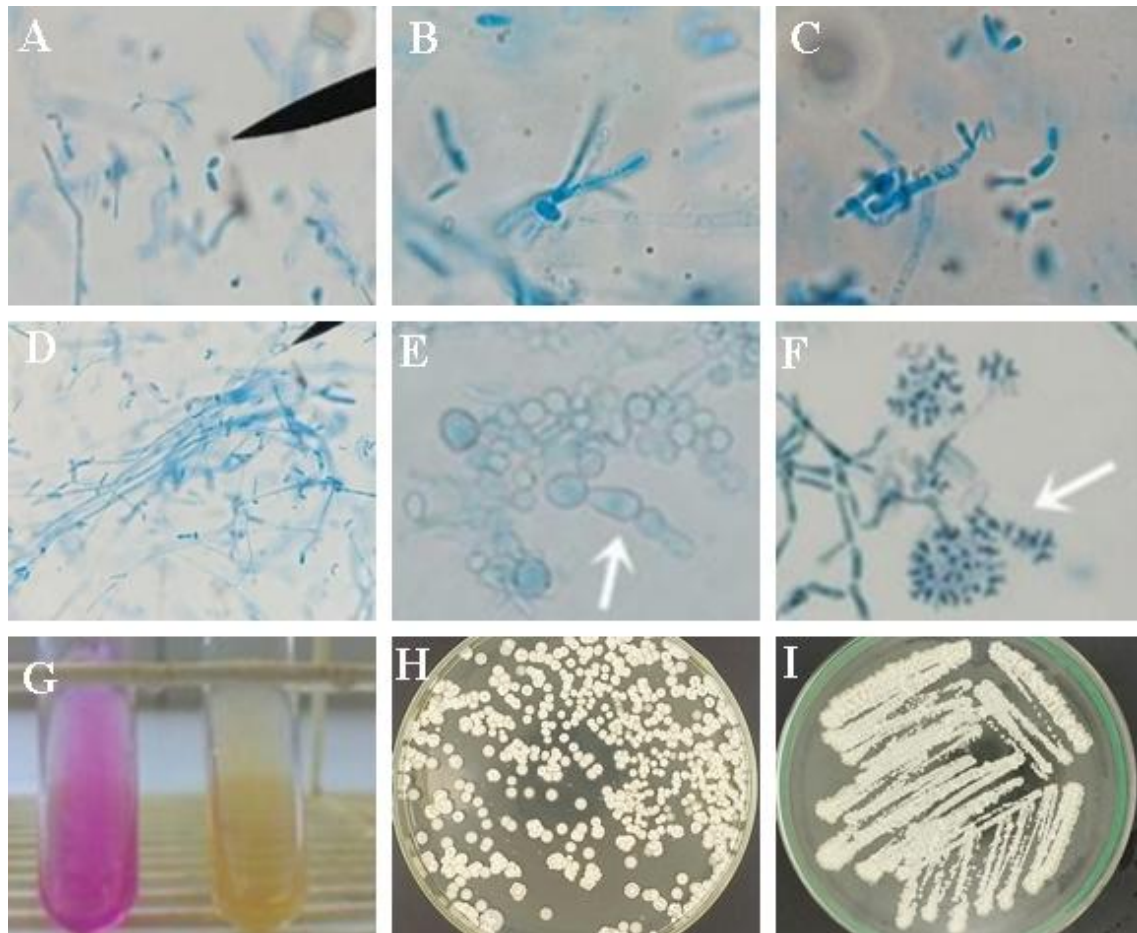
Em casos positivos a macroscopia das colônias cultivadas em Ágar Sabouraud dextrose exibem um tempo de crescimento variável, entre 2 e 7 dias, apresentando-se com aparência cerebriforme ou rugosa, em tonalidades que vão do branco ao bege, com textura seca ou rugosa (GUÉHO et al., 1992; DE HOOG et al., 2000). Quando cultivadas em meio CHROMagar *Candida*® (BD Diagnostic Systems-França), adquirem coloração azulada, que pode variar para verde, dependendo da espécie (Bentubo; Gambale; Fischman, 2013).

Os fungos do gênero *Trichosporon* são classificados como leveduriformes, embora apresentem a capacidade de pleomorfismo. Microscopicamente, podem ser observadas em formas distintas, como blastoconídios (**Figura 5A**), artroconídios (**Figuras 5B e 5C**), hifas verdadeiras (**Figura 5D**) e pseudo-hifas (**figura 5E**). Essas estruturas podem estar presentes simultaneamente em uma única amostra (Colombo; Padovan; Chaves, 2011). Adicionalmente, algumas espécies apresentam apressórios

(**figura 5F**), estruturas típicas do gênero que auxiliam no diagnóstico fenotípico, sendo identificadas através da técnica de microcultivo em ágar malte (Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008).

Para a identificação definitiva de *Trichosporon* spp., analisam-se características morfológicas, incluindo observações macroscópicas das colônias, testes bioquímicos, análises analíticas e moleculares (Almeida-Júnior; Hennequin, 2016). Nos testes bioquímicos e fisiológicos, verifica-se que essas espécies não fermentam carboidratos, utilizando o metabolismo oxidativo para assimilar açúcares como glicose, sacarose, galactose, lactose e maltose. O teste de urease (**Figura 5G**) é conduzido em meio ágar ureia de Christensen, sendo positivo para esse gênero. Isso demonstra que ele é capaz de degradar ureia por meio da enzima urease, liberando amônia, que eleva o pH do meio, tornando-o mais alcalino e mudando sua coloração de amarelo para rosa. Essa característica é comum a todos os basidiomicetos (Lacaz et al., 1998; Bentubo; Gambale; Fischman, 2013).

**Figura 5.** Macro e micromorfologia de *Trichosporon* spp.



**Legenda:**(A) blastoconídios; (B) e (C) arthroconídios (D) hifas verdadeiras; (E) pseudo-hifas; (F) presença de apressório; (G) teste de urease; (H) e (I) morfologia das colônias de *Trichosporon* spp.

**Fonte:** Silva, 2020

O diagnóstico molecular é amplamente reconhecido como o método mais preciso para identificar espécies específicas de microrganismos. Dentre essas técnicas, a reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) destaca-se como uma das mais empregadas. No caso do gênero *Trichosporon*, as regiões mais comumente analisadas incluem o DNA ribossômico 26S e 5S, além das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*Intergenic Spacer*). Outra combinação de regiões frequentemente investigada são D1/D2 associadas às sequências ITS e IGS1 (Colombo; Padovan; Chaves, 2011; Dabas, Xess e Kale, 2017).

Adicionalmente, a técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz, conhecida como MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*), permite a análise precisa de moléculas proteicas com base em seus pesos moleculares. Essa abordagem destaca-se por sua rapidez, alta

confiabilidade e excelente reprodutibilidade, sendo amplamente utilizada para fins diagnósticos (Taverna et al., 2014; Wang et al., 2016).

## 2.4 Tratamento

Apesar de os fatores de transmissão ainda não serem totalmente compreendidos, é sabido que condições como calor, umidade, uso de compostos oleosos e práticas inadequadas de higiene, quando combinados com ambientes tropicais, favorecem a proliferação de infecções superficiais causadas por *Trichosporon* spp. O tratamento recomendado para a piedra branca consiste no corte dos cabelos ou pelos afetados, aliado ao uso de xampu contendo cetoconazol (Pontes et al., 2002; Ferreira et al., 2019). Por outro lado, os antifúngicos clássicos de aplicação tópica geralmente são ineficazes no tratamento de onicomicoses (Rosen et al., 2015). No entanto, compostos como amorolfina e ciclopirox, apresentados em forma de verniz, demonstram eficácia. Para tratamento oral, as opções incluem terbinafina, ITZ e FLZ. Uma inovação terapêutica inclui o uso de efinaconazol e tavaborol, que demonstraram atividade antifúngica tópica e receberam aprovação do Food and Drug Administration (FDA) (Perusinha; Rosado; Lencastre, 2019).

No caso das infecções fúngicas invasivas (IFIs), o tratamento apresenta desafios significativos devido às dificuldades diagnósticas e possíveis erros na identificação. *Trichosporon* spp. exibem resistência intrínseca às equinocandinas, uma classe de antifúngicos também ineficaz contra espécies de *Cryptococcus*. Quanto aos azólicos, seu uso profilático e terapêutico pode favorecer o surgimento de cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLZ, o que constitui uma grave preocupação clínica (Day et al., 2013).

Os poliênicos, uma classe de antifúngicos naturais com ação fungicida de amplo espectro, têm sido utilizados desde a década de 1950 (Campoy e Adrio, 2016). Inicialmente, acreditava-se que sua interação com o ergosterol na membrana celular fúngica promovia a formação de poros, levando à morte celular (Ostrosky-Zeichner et al., 2010). No entanto, estudos mais recentes indicam que os poliênicos agem formando agregados que removem o ergosterol essencial da membrana plasmática do fungo, sendo este o mecanismo principal de ação (Anderson et al., 2014).

Embora os poliênicos possam causar efeitos adversos, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, devido à semelhança entre o colesterol humano e o ergosterol fúngico (Ostrosky-Zeichner et al., 2010), ajustes nas doses de AMB são realizados na prática

clínica para maximizar a eficácia, minimizando os efeitos tóxicos. Apesar do uso prolongado dessa classe de medicamentos na medicina, relatos de resistência aos poliênicos permanecem escassos (Perfect et al., 2010; Vincent et al., 2013).

Os antifúngicos azólicos atuam na inibição da biossíntese do ergosterol ao bloquear a enzima citocromo P-450 lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase. Eles apresentam ação fungicida contra fungos filamentosos e efeito fungistático sobre leveduras (Xie et al., 2014; Chang et al., 2017). Essa classe é subdividida em imidazólicos, que possuem dois átomos de nitrogênio no anel azólico, e triazólicos, que contêm três. Os imidazólicos são geralmente usados no tratamento de infecções superficiais e não têm eficácia relevante contra infecções fúngicas invasivas (IFIs). Em contrapartida, os triazólicos, como VRZ, ITZ e PZC, são preferidos para esses casos (Shapiro; Robbins; Cowen, 2011). Essa classe de fármacos é amplamente utilizada em ambientes hospitalares devido à baixa toxicidade em comparação aos poliênicos, embora o uso frequente tenha favorecido o surgimento de resistência em espécies de *Candida* (Centers For Disease Control And Prevention, 2013; Mccarty; Pappas et al., 2016).

É essencial desenvolver e testar estratégias terapêuticas mais eficazes. A combinação de medicamentos tem despertado o interesse da comunidade científica como uma alternativa promissora para combater infecções persistentes, muitas vezes mais eficaz do que a administração isolada de antimicrobianos. Quando aplicada de forma criteriosa, essa abordagem pode não apenas superar a resistência fúngica, mas também melhorar o prognóstico do paciente (Zimmermann; Lehar; Keith et al., 2007; Hill; Cowen, 2015).

As estratégias de combinações farmacológicas incluem ações como retardar ou prevenir o surgimento de resistência, utilizar associações de antibióticos com inibidores enzimáticos (como  $\beta$ -lactâmicos combinados com inibidores de  $\beta$ -lactamases), e modificar mutações utilizando interações entre medicamentos. A sinergia entre as drogas pode reduzir as doses necessárias, minimizando a toxicidade associada (King et al., 2014; Wood et al., 2014; Chevereau; Bollenbach, 2015; Baym; Stone; Kishony, 2016).

## 2.5 Novos alvos terapêuticos em *Trichosporon* spp.

### 2.5.1 *Ciclosporina A: Inibidor de Calcineurina*

A calcineurina é uma proteína altamente preservada em organismos eucarióticos, desempenhando um papel essencial na regulação das respostas ao estresse em plantas e fungos. Trata-se de uma fosfatase dependente de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e calmodulina (Aramburu et al., 2004; Chen et al., 2011), responsável por transmitir sinais da membrana celular até o núcleo (Steinbach et al., 2007; Stie et al., 2008). Essa enzima é constituída por duas subunidades distintas: a subunidade "A", de caráter catalítico, e a subunidade "B", com função moduladora. Quando há um aumento nos níveis de cálcio intracelular, a calmodulina se associa à subunidade A da calcineurina, bloqueando a atividade do domínio C-terminal e, conseqüentemente, eliminando sua autoinibição, o que leva à formação do complexo ativo da calcineurina (Chen et al., 2010; Ulengin-Talkish; Cyert, 2023).

Ademais, esta proteína desempenha um papel fundamental na adaptação ao estresse térmico, em temperaturas altas e baixas, além de estar envolvida na resposta ao estresse induzido por cátions em *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Outrossim, essa proteína é essencial para a adaptação e o crescimento desses organismos em ambientes de pH alcalino. Em *Candida albicans*, a calcineurina auxilia na detecção de sinais de invasão ao tecido do hospedeiro e na disseminação da infecção (Blankenship et al., 2003; Chen et al., 2010; Yadav; Heitman, 2023).

A calcineurina está relacionada a diversos agentes infecciosos, incluindo fungos patogênicos oportunistas em humanos, como algumas cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. O papel dessa proteína varia entre os principais fungos patogênicos. Em um estudo realizado por Steinbach e colegas (2006), mutantes de *Cryptococcus neoformans* contendo calcineurina exibiram um crescimento significativamente prejudicado a 37 °C, tornando-se avirulentos. Por outro lado, em *Candida albicans*, a calcineurina não foi indispensável para a sobrevivência in vitro nessa mesma temperatura, mas foi essencial para a sobrevivência no soro e para a manutenção da virulência (Steinbach et al., 2007; Zheng et al., 2023).

Em *Candida albicans*, a calcineurina tem sido reconhecida como um componente essencial para a sobrevivência celular em condições que comprometem a integridade da membrana plasmática, especialmente quando exposta a substâncias que bloqueiam a

síntese de ergosterol (Cruz et al., 2002). O modelo proposto indica que a calcineurina se torna imprescindível quando a estrutura celular está prejudicada (Blankenship et al., 2003; Zheng et al., 2023). Com base nessas evidências, sugere-se que a calcineurina seja fundamental para a preservação da viabilidade de *Candida albicans* durante infecções, desempenhando um papel crucial no início da colonização e na fase de candidemia, um estágio crítico no ciclo infeccioso desse fungo (Onyewu et al., 2006; Li et al., 2021).

A via da calcineurina apresenta importância na regulação de respostas ao estresse e desenvolvimento em fungos leveduriformes e filamentosos, como também, na virulência de diversos patógenos que acometem humanos e animais (Juvvadi et al., 2017). Estudos em modelo fúngico de *Saccharomyces cerevisiae*, mostraram que a calcineurina e proteínas envolvidas na via de sinalização possuem relação com crescimento fúngico, patogenicidade, virulência, crescimento em temperatura corporal do hospedeiro, sobrevivência no soro e adesão celular ao tecido do hospedeiro (Chen et al., 2010; Yadav; Heitman, 2023).

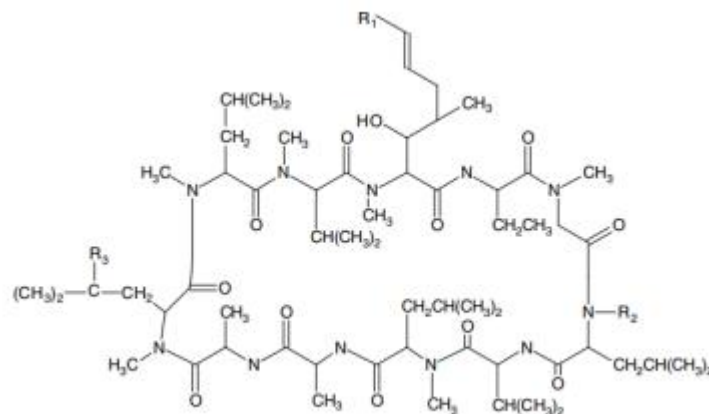
A calcineurina detém como alvo o fato de ativação de células T (NFAT) em mamíferos. De tal modo, a regular os sistemas imunológico, neurológico, vascular e endócrino – no quais desempenham funções biológicas essenciais (Crabtree; Schreiber, 2009; Chen et al., 2010; Ulengin-Talkish; Cyert, 2023).

A função da calcineurina é regulada não apenas pelo cálcio e pela calmodulina, mas também por diversos inibidores dessa enzima, identificados ao longo dos últimos anos. Pesquisas recentes ressaltam a relevância da via de sinalização calcineurina-NFAT nas respostas do sistema imunológico. A calcineurina se destaca como um alvo terapêutico essencial, especialmente na modulação imunológica, por meio de inibidores como a CsA (Martinez et al., 2024).

Os organismos eucariotos possuem no mínimo, um gene encarregado por codificar as subunidades A e B o que as tornam indispensáveis para a atividade da calcineurina (Zang et al., 2012), sendo o principal alvo de drogas imunossupressoras, como a ciclosporina A (CsA) que inibem essa proteína o que suprime o sistema imunitário (Liu et al., 1991). Este fármaco possui aprovação das agências reguladoras para serem comercializadas em forma de drogas imunossupressoras para transplante de órgãos (Chen et al., 2010).

**CsA** é um polipeptídeo obtido a partir de extratos do fungo telúrico *Tohyocladium inflatum*, sua estrutura química é composta por 11 aminoácidos, com fórmula  $C_{62}H_{111}O_{12}$  e peso molecular 1.202,6 (**Figura 6**). Este medicamento tem sido empregado na prevenção da rejeição de transplantes de órgãos em seres humanos desde 1977, sendo também utilizado como imunomodulador em diversas doenças inflamatórias da pele, como dermatite atópica e psoríase (Cardenas et al., 1999).

**Figura 6.** Estrutura química da **CsA**



**Fonte:** Akhlaghi, 2002

Devido às suas características lipofílicas, a **CsA** é amplamente distribuída na maioria dos tecidos, exceto na barreira hematoencefálica. Esse fármaco é predominantemente metabolizado pelo sistema enzimático citocromo P450, especificamente pela CYP3A4, no fígado e no intestino. Medicamentos que inibem o CYP3A4 ou que competem com a glicoproteína-P podem modificar significativamente o metabolismo da **CsA** (Cruz et al., 2002).

Os medicamentos imunossupressores ciclosporina A, FK-506 (tacrolimus) e rapamicina (sirolimus) são utilizados para tratar e prevenir a rejeição de órgãos transplantados, mas também apresentam poderosos efeitos antifúngicos contra diversos fungos patogênicos (BADER et al., 2003; Uppuluri et al., 2008). Os estudos indicam sinergismo entre os azólicos e inibidores da calcineurina, como a **CsA** e o FK-506, e as pesquisas *in vivo* mostraram que a combinação sinérgica **CsA/FLZ** tem um efeito terapêutico positivo. Em resumo, esses agentes farmacológicos, altamente eficazes,

podem ter uma aplicação clínica ainda mais significativa no combate a infecções (Blankenship et al., 2003; Bader et al., 2003; Onyewu et al., 2006).

A utilização de CsA frente as IFIs foram amplamente estudadas, como resultado, estabeleceu-se que o mecanismo de ação formados por essa substância, inibem a atividade de calcineurina em fungos patogênicos, contudo, considerando-se o impacto imunossupressor desta droga, seu uso não é indicado como monoterapia ao tratamento de infecções fúngicas, entretanto, quando CsA associa-se a outras classes antifúngicas, exibem efeitos sinérgicos que resultam na potencialização fungicida (Juvvadi et al., 2017).

Pesquisa regida por Li e colaboradores (2008) evidenciou o sinergismo entra CsA + ITZ, FLZ e VRZ, testados em *Candida albicans* resistente aos azólicos. Ademais, as concentrações das drogas durante o sinergismo são menores quando comparada ao seu uso de forma individual, o que sugere que baixas doses podem ser administradas para a terapia contra infecções fúngicas. Acrescentando, Shinde e colaboradores (2012) mostraram atividade sinérgica da CsA com drogas antifúngicas (VRZ, FLZ, AMB e CASP) contra o crescimento planctônico e a formação de biofilme de *C. albicans*. Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que a inibição da calcineurina é intermediada por mecanismos específicos do biofilme e amplifica a ação de antifúngicos contra biofilmes resistentes aos medicamentos.

O aumento da sensibilidade das células planctônicas e a reversão da resistência a fármacos na forma de biofilme em formação após a adição da CsA sugerem que a calcineurina pode desempenhar um papel crucial na resistência à FLZ, VRZ e CASP. Contudo, o mecanismo exato por trás da interação sinérgica da CsA com os antifúngicos ainda não é completamente compreendido (Uppuluri et al., 2008).

### **2.5.2 Radicol: Inibidor de Hsp90**

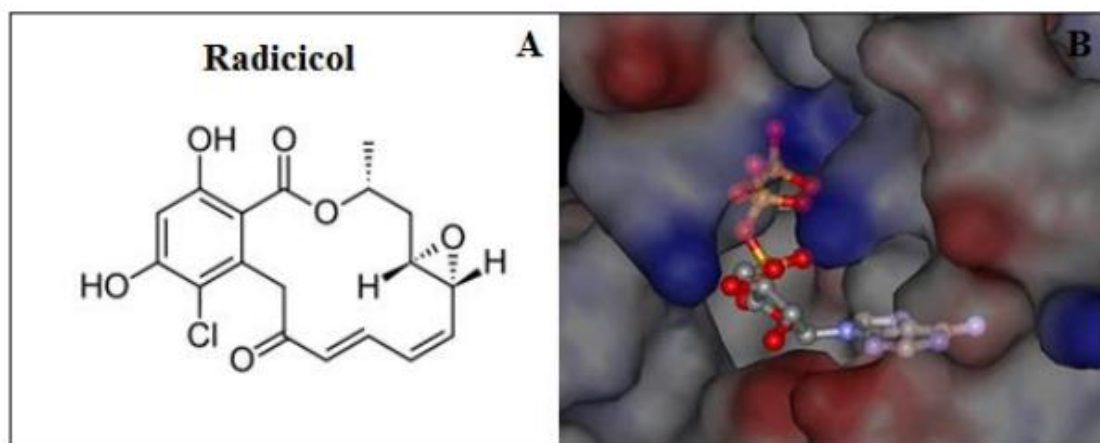
As chaperoninas Hsp são proteínas com vasta distribuição em seres vivos procariotos e eucariotos (Burnie et al., 2006). Seu papel primordial é auxiliar outras proteínas a aperfeiçoarem uma conformação tridimensional, tornando-as ativas. Esses compostos, também são nomeados como proteínas do choque térmico (do inglês *heat shock proteins*), levando em consideração que sua descoberta está atrelada ao aumento de sua expressão por meio de estresses térmicos em ensaios produzidos em *Drosophila melanogaster* (Ferruccio, 1962; Wang et al., 2006).

No entanto, diversas condições podem desencadear o aumento de sua expressão, como estresse nutricional, variações de pH, desidratação, exposição à luz ultravioleta, angiogênese, carcinogênese, entre outras (Burnie et al., 2006). Existem diferentes tipos distintos de proteínas Hsp, (Hsp 100, Hsp90, Hsp70, Hsp 60 e *small* Hsp) que são classificadas de acordo com seu peso molecular (por exemplo, a Hsp90 com peso molecular de aproximadamente 90 kDa), que individualmente, exercem funções distintas e essenciais nos processos de sinalização celular (Burnie et al., 2006; Fiori et al., 2012; Lamoth et al., 2012; Mayer et al., 2012; Tamayo et al., 2012; Batista et al., 2015b).

Múltiplos estudos indicam que a Hsp90 é um excelente alvo terapêutico no tratamento de diferentes tipos de câncer e aterosclerose (Lee et al., 2012; Madrigal-Matute et al., 2012; Miyata et al., 2013; Schmid; Multhoff, 2012; Taipale et al., 2010; Whitesell et al., 2012). Esses relatos estão baseados no bloqueio da Hsp90 por meio de várias abordagens, como o uso de anticorpos monoclonais, a produção de mutantes para o gene responsável pela expressão da Hsp90 ou a administração de medicamentos que inibem a atividade ATPásica dessas proteínas, como a geldamicina e o radicicol (Burnie et al., 2006; Fiori et al., 2012; Lamoth et al., 2012; Mayer et al., 2012; Tamayo et al., 2012).

O radicicol (**Figura. 7A**), também conhecido como monorden, KF9-A, KF58332 e NSC294404, é uma substância natural com peso molecular de 364,77 e fórmula química  $C_{18}H_{17}ClO_6$ . Isolado pela primeira vez em 1953 do fungo *Diheterospora chlamydosporia* (Cookson et al., 2014). Este fármaco apresenta propriedades antifúngicas, antiparasitárias e antitumorais, sendo reconhecido por sua capacidade de inibir a atividade ATPásica das Hsp90 (**Figura. 7B**), ligando-se ao domínio N-terminal da proteína com alta afinidade. Comercializado como um pó cristalino (liofilizado), solúvel em diluentes orgânicos e em DMSO, com uma solubilidade de cerca de 20 mg/mL e estabilidade de até dois anos quando armazenado a -20°C (Cookson et al., 2014). O potencial antifúngico do radicicol já foi investigado contra patógenos como *C. albicans* (Cowen et al., 2006), *Aspergillus* spp. (Chen; Lewis; Kontoyiannis, 2011), *P. brasiliensis* (Nicola et al., 2008) e *Cryptococcus* spp. (Cordeiro et al., 2016). Contudo, não há registros conclusos na literatura sobre o efeito do radicicol contra *Trichosporon* spp.

**Figura 7.** Estrutura química do radicicol e sítio alvo de ligação à Hsp90



**Legenda:** (A) estrutura química do radicicol. (B) estrutura cristalográfica do sítio de ligação de ATP das Hsp90 – alvo do radicicol

**Fonte:** Evangelista, 2015.

Diversas pesquisas reafirmam a relevância das proteínas Hsp também em patógenos fúngicos. As células de *Candida albicans*, sofrem aumento de proliferação a diferentes tipos de estresses, após a expressão dessas proteínas. Progressivamente, os cientistas acumularam provas de que a expressão dessas proteínas é essencial para a morfogênese, a transição entre micélio e levedura, a conidiogênese, a integridade da parede celular e a sinalização celular em geral em vários patógenos fúngicos, como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Cryptococcus. neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton rubrum*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Burnie et al., 2006; Lamoth et al., 2012; Tamayo et al., 2012).

Pesquisas demonstram a importância das proteínas Hsp fúngicas durante o processo infeccioso (Dai et al., 2012; Shapiro; Cowen, 2012; Shapiro; Cowen, 2010; Shapiro et al., 2009). Já foi demonstrado que, em *C. albicans*, as proteínas Hsp90 aceleram a evolução da resistência aos antifúngicos, principalmente aos azólicos e equinocandinas, tanto em células planctônicas quanto na dispersão e resistência a antifúngicos em biofilmes (Cowen et al., 2009; Cowen; Lindquist, 2005; Robbins et al., 2011; Singh et al., 2009). Diante da relevância das Hsp, especialmente da Hsp90, para a homeostase celular, seu papel como alvo terapêutico molecular é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias antifúngicas.

### 3 HIPÓTESES

- Dada a sua virulência, *T. asahii* deve ser o principal agente etiológico das tricosporonoses invasivas em pacientes pediátricos no Estado do Ceará;
- A tricosporonose invasiva é mais frequente nos pacientes com câncer e neoplasias hematológicas, causando-lhes maior mortalidade em comparação com os pacientes sem essas condições;
- A inibição da calcineurina – proteína envolvida no controle do crescimento fúngico, resposta ao estresse celular e síntese da parede celular – deve inibir o crescimento planctônico e o biofilme de isolados clínicos de *Trichosporon* spp.;
- Dada a importância da Proteína do Choque Térmico 90 (Hsp90) na homeostase celular, sua inibição deve causar a morte de células planctônicas e biofilmes de *Trichosporon* spp.;

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Conhecer o perfil clínico e epidemiológico das infecções invasivas por *Trichosporon* spp. em um hospital pediátrico terciário no Estado do Ceará, bem como, averiguar o efeito da inibição das proteínas calcineurina e Hsp90 no crescimento fúngico.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características clínico-epidemiológicas e laboratoriais dos casos de tricosporonose invasiva ocorridos entre os anos 2012 e 2024 em um hospital pediátrico de referência;
- Caracterizar os isolados clínicos de *Trichosporon* spp. quanto à sensibilidade a antifúngicos e capacidade de formação de biofilmes;
- Avaliar o efeito da inibição de calcineurina pelo fármaco ciclosporina sobre a formação, desenvolvimento e a resposta à antifúngicos em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.
- Investigar as interações moleculares entre a ciclosporina e a calcineurina de *T. asahii* em ensaios *in silico*;
- Avaliar o efeito da inibição da proteína Hsp90 pelo fármaco radicicol sobre o crescimento celular, a virulência em *G. mellonella*, bem como sobre a formação, o desenvolvimento e a resposta à antifúngicos em biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Desenho experimental

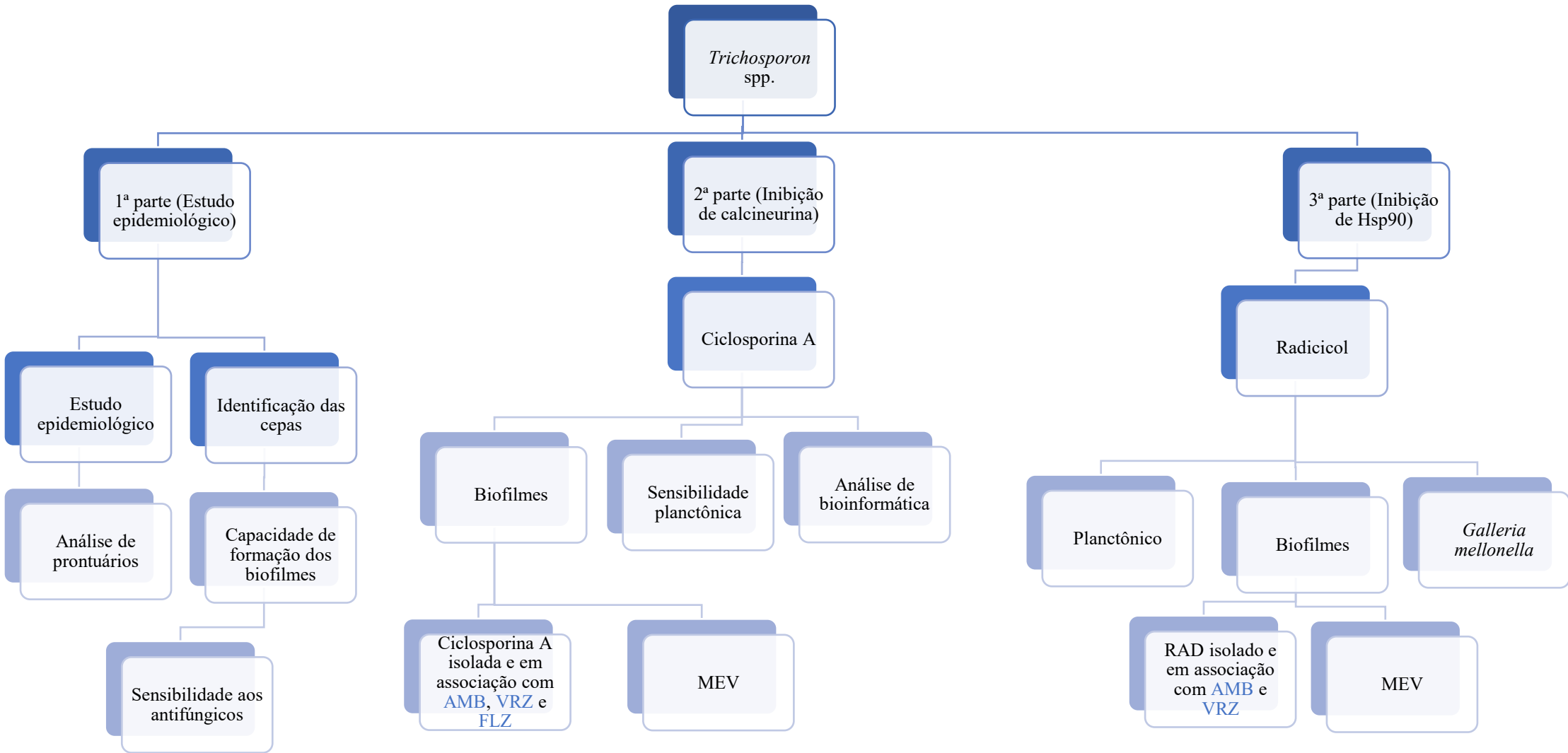
Este trabalho foi organizado em três etapas distintas, de acordo com a sequência dos procedimentos representados no organograma da **figura 8**.

A parte inicial deste estudo, trata-se de uma coleta de dados de caráter epidemiológico, com bases retrospectiva e prospectiva, realizada no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS). Foram analisados prontuários de pacientes com culturas microbiológicas positivas para o crescimento de *Trichosporon* spp.

A segunda etapa constituiu-se na investigação do efeito inibitório da ciclosporina (CsA) em células planctônicas e biofilmes de *Trichosporon* spp. O impacto da inibição de calcineurina foi avaliado pelos testes de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio (MTT), Cristal Violeta e visualização ultraestrutural por MEV. Por fim, estudos de *docking* molecular/análise *in silico* foram realizados para entender a ligação de CsA à calcineurina de *T. asahii*.

A terceira e última parte experimental, fundamentou-se no efeito da inibição de Hsp90 por meio do fármaco radicicol (RAD) sobre células planctônicas e biofilmes de *Trichosporon* spp. O efeito do tratamento com RAD sobre a virulência de *Trichosporon* spp. foi avaliada no modelo experimental de *Galleria mellonella*.

Figura 8. Organograma representativo das etapas metodológicas do estudo.



## **5.2 1ª PARTE EXPERIMENTAL – ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO**

### ***5.2.1 Local do Estudo***

Os dados epidemiológicos deste trabalho foram coletados através dos prontuários disponibilizados pelo HIAS.

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Bioagentes Infecciosos (BIOS) pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). A morfologia dos biofilmes foi analisada por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) na Central Analítica da UFC.

### ***5.2.2 Modelo da Pesquisa***

Trata-se de um estudo observacional do tipo transversal, retrospectivo e prospectivo, realizado em um período de 144 meses (01 de janeiro de 2012 à 31 de dezembro de 2024) o que corresponde a um período temporal de 12 anos.

Este estudo dividiu-se em uma vertente retrospectiva (2012 a agosto 2020) e prospectiva (setembro 2020 a 2024).

Assim, a finalidade deste estudo fundamentou-se em analisar de maneira clínica, epidemiológica e laboratorial as infecções de sítios profundos por fungos do gênero *Trichosporon spp* em pacientes pediátricos em um hospital terciário de referência.

### ***5.2.3 Aspectos Éticos***

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do HIAS, localizada na Rua Tertuliano Sales, nº 544 - Vila União, Fortaleza - Ceará (CE), 60.410-794, com número do parecer 4.840.740 e número do processo CAAE: 44139021.8.3001.5042.

A confidencialidade e a anonimização das informações foram tratadas de forma discreta, sendo obtidas por meio de credenciais de acesso, assegurando a proteção das identidades e demais dados dos pacientes.

É importante destacar que as informações foram empregadas exclusivamente para propósitos científicos. Os exames integram a assistência fornecida aos participantes, e as amostras terão o mesmo destino que as demais do setor (Resolução - RDC nº 15, de 15 de março de 2012). Os resultados do estudo estarão disponíveis para os pacientes, responsáveis e demais interessados por um período de 5 anos.

#### 5.2.4 *Coleta de dados clínicos e epidemiológicos*

Os dados dos pacientes utilizados nas análises da pesquisa foram obtidos por meio de seus prontuários clínicos, com o auxílio do sistema de laudos do hospital e da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), com o objetivo de identificar as variáveis do estudo (**anexo 1**).

#### 5.2.5 *Crítérios de inclusão e exclusão de amostras*

##### 5.2.5.1 *Crítérios de inclusão*

- Pacientes de 0 a 18 anos de idade;

Pacientes com amostras de diferentes sítios de infecções invasivas, em laudo de *Trichosporon* spp. de forma isolada ou associada a outro patógeno em mesma data da coleta, por meio de diagnóstico automatizado - VITEK® 2 Compact – bioMérieux;

- Pacientes que possuam prontuários médicos disponíveis ou contendo informações suficientes/claras.

##### 5.2.5.2 *Crítérios de exclusão*

- Amostras fora dos critérios de adequados de conservação, acondicionamento e transporte, como também, sem identificação ou com identificação ilegível.
- Pacientes nos quais não se obteve desfecho definido de alta ou óbito.

#### 5.2.6 *Definições*

Fungemia causada por *Trichosporon* spp. foi definida como o isolamento de qualquer espécie de *Trichosporon* de uma cultura de sangue obtida de uma veia periférica ou de um cateter intravascular de pacientes sintomáticos sem sinais de infecção noutros locais do corpo. Tricosporonose invasiva foi definida como o isolamento de qualquer espécie de *Trichosporon* em biopsias de órgãos, líquido cefalorraquidiano (LCR), fluidos cavitários (peritoneal, pleural, pericárdico e sinovial), urina e secreções respiratórias em um paciente sintomático. A fungemia que ocorreu mais de 30 dias após o primeiro isolamento de *Trichosporon* spp. foi definida como um novo caso. As infecções associadas aos cuidados de saúde foram definidas como as que ocorreram 48 horas após a admissão hospitalar.

#### 5.2.7 *Procedimento laboratorial*

As amostras clínicas (sangue e fluidos cavitários) foram processadas utilizando o sistema BACT/ALERT® 3D (bioMérieux, França). As amostras acusadas como positivas

pelo equipamento foram semeadas em Agar Sangue de Carneiro, Agar Chocolate e Agar MacConkey, a fim de avaliar o crescimento microbiano por meio da morfologia das colônias. As amostras sem positividade pelo equipamento foram consideradas negativas após cinco dias de incubação a 37°C.

Pontas de cateter foram processadas pela técnica semi-quantitativa de Maki em placa de ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro; as culturas que exibiram crescimento  $\geq 15$  ufc foram consideradas positivas (Maki et al., 1977).

Amostras de líquido peritoneal foram semeadas em placas de Agar Sangue de Carneiro e Ágar MacConkey e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas às 37°C.

As amostras de urina foram semeadas manualmente em placas CHROMagar™ Orientation (Plastlabor, Rio de Janeiro, Brasil) utilizando uma alça calibrada de 0,001 e incubadas por 24h às 37°C para contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL). O crescimento  $\geq 10^5$  UFC/mL em culturas de pacientes sintomáticos internados foi considerado positivo (Doern & Richardson, 2016).

Após crescimento nos meios de cultura supracitados, colônias sugestivas de *Trichosporon* spp. foram avaliadas quanto à micromorfologia após coloração de Gram. A identificação presuntiva dos isolados foi realizada pelo sistema VITEK® 2 Compact (bioMérieux, França). Não foram avaliados biomarcadores fúngicos neste estudo.

### **5.2.8 Análise laboratorial**

#### **5.2.8.1 . Seleção e tratamento dos isolados de interesse**

As etapas pré-analítica, analítica e pós-analítica relacionadas às amostras dos pacientes da pesquisa foram conduzidas no HIAS, especificamente no Laboratório de Diagnósticos Clínicos, na Seção de Microbiologia. A identificação dos isolados foi realizado com o suporte do sistema automatizado VITEK® 2 Compact – bioMérieux.

### **5.2.9 Microrganismos**

No estudo epidemiológico prospectivo foram coletadas 19 cepas, as quais, foram identificadas de forma primária através do VITEK® no Laboratório de Análises Clínicas no Setor de Microbiologia do HIAS. Após serem aplicados os critérios de análises para a pesquisa, notou-se que sete destes pacientes não possuíam desfecho definido, assim, para fins experimentais foram testadas 12 cepas.

### 5.2.10 Capacidade de formação dos biofilmes

Os biofilmes foram formados conforme descrito por Cordeiro et al. (2015) com adaptações. O inóculo foi preparado a partir de culturas de 48 h previamente cultivadas em Ágar Dextrose de Batata (PDA, Himedia, Mumbai, Índia). Alíquotas de 200 µl de cada suspensão fúngica ajustada para  $2 \times 10^6$  células/ml em meio RPMI foram adicionadas a microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo plano e incubadas a 80 rpm, a 35 °C, por 6 h (período de adesão). Após a incubação, as células não aderentes foram removidas por lavagem com solução salina 0,9%. Depois, os poços foram preenchidos com RPMI e incubados a 35 °C por até 48 h (período de maturação).

A capacidade de formação de biofilme de cada isolado foi avaliada de acordo com Stepanovic et al. (2003) após a medição da densidade óptica (DO), usando o ensaio de cristal violeta (Peeters et al., 2008). Os testes foram realizados em triplicata e os poços contendo apenas meio de cultura sem inóculo foram usados como controle negativo. Os valores de corte da densidade óptica (DOc) para o ensaio de formação de biofilme foram definidos como três desvios-padrão acima da DO média do controle negativo. As cepas foram classificadas em quatro categorias: não produtoras de biofilme ( $DO \leq DOc$ ), produtoras fracas ( $DOc < DO \leq 2xDOc$ ), produtoras moderadas ( $2xDOc < DO \leq 4xDOc$ ) e produtoras fortes ( $4xDOc < DO$ ).

### 5.2.11 Drogas utilizadas

As cepas coletadas referentes ao estudo epidemiológico foram testadas frente a **AMB**; Sigma, EUA e **VRZ**; Pfizer, EUA que foram diluídos em DMSO 100%; **FLZ**; Pfizer, Brasil foi preparado em água destilada estéril (CLSI, 2012), de acordo com o documento M27-A4 do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Todos antifúngicos foram testados na concentração inicial de 128 µg/mL.

### 5.2.12 Sensibilidade planctônica

A sensibilidade de células planctônicas de *Trichosporon* spp., foi realizada de acordo o teste de suscetibilidade seguindo o método de micro diluição em caldo, conforme o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). As cepas foram previamente cultivadas em meio ágar batata dextrose (Himedia®, Índia) a 35 °C por 48 horas. Colônias isoladas foram suspensas em 5 ml de solução salina estéril a 0,9%, e a turbidez foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland.

Em seguida, a suspensão foi diluída em proporções de 1:50 e posteriormente 1:20 com RPMI 1640, resultando em um inóculo de células planctônicas contendo entre 0,5 e  $2,5 \times 10^3$  células/mL. Os testes de suscetibilidade foram realizados em placas de microdiluição com 96 cavidades (CLSI, 2008). Os antifúngicos **AMB**, **VRZ** e **FLZ** foram empregados neste experimento. Cada composto foi avaliado nas seguintes faixas de concentrações: 1 – 64µg/mL para **AMB**, 0,06 – 4µg/mL para **VRZ** e 0,5 – 4 para **FLZ**, conforme as recomendações do protocolo mencionado anteriormente.

As placas foram incubadas a 35 °C, e o crescimento fúngico foi monitorado por observação visual após 48 horas. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram estabelecidas de acordo com as orientações do CLSI. Para **AMB**, a CIM foi definida como a menor concentração do composto que causou a inibição total do crescimento (CIM 100). Em contrapartida, para os azóis (**VRZ** e **FLZ**), as CIMs corresponderam à concentração mais baixa com inibição de 50% do crescimento (CIM 50), em relação ao controle sem fármacos (CLSI, 2008).

*C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como padrão de qualidade dos ensaios (CLSI, 2008).

### 5.2.13 Sensibilidade dos biofilmes

Os biofilmes foram formados conforme descrito acima (**item 5.2.8**) e, após 48 h de incubação, as placas foram lavadas com solução salina estéril 0,9%. Alíquotas de 200 µl de RPMI contendo **AMB**; Sigma, **FLZ**; Pfizer, ou **VRZ**; Pfizer, em concentrações que variaram de 8 µg/mL a 128 µg/mL, foram adicionadas aos biofilmes maduros. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. A atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio de brometo de tetrazólio (MTT) (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018). Os experimentos foram conduzidos em duplicata e os controles foram cultivados em RPMI sem antifúngicos. A concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento do biofilme para **AMB** (Di Bonaventura et al., 2006) e 50% para os azólicos (Liao et al., 2014), quando comparado aos controles sem drogas.

As análises foram realizadas em triplicata (poços independentes) e em dois ensaios diferentes. Os controles foram cultivados em meio RPMI sem antifúngicos.

#### **5.2.14 Análise estatística**

Os dados qualitativos foram expressos em frequências absolutas, enquanto os dados quantitativos como média e desvio-padrão. Para os dados qualitativos, investigou-se associações por meio do teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. Para os dados quantitativos, inicialmente investigou-se a adesão à curva normal por meio do teste de Shapiro-Wilk. Como os dados se mostraram não paramétricos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Todas as análises foram conduzidas no software Jamovi (versão 2.3.28), adotando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **5.3 2ª PARTE EXPERIMENTAL – INIBIÇÃO DE CALCINEURINA**

### ***5.3.1 Microrganismos***

Foram empregados um total de treze isolados clínicos de *Trichosporon* spp., contidos no estoque da micoteca do Laboratório de Bioagentes Infecciosos, sendo sete de *T. asahii* e seis de *T. inkin*, representados na tabela abaixo (**tabela 1**) com características de identificação e sítio isolado. Anterior ao início das análises, as estirpes foram recuperadas mediante repiques em Ágar Batata dextrose (Himedia®, Brasil) com incubação à 35° por 48h em todas as etapas experimentais.

A identificação dos fungos foi realizada através de testes bioquímicos, como a capacidade de utilizar ureia como fonte de nutrição (teste de urease), assimilação de carboidratos e identificação micromorfológica em Ágar Malte (Himedia®, Brasil) (De Hoog et al., 2000).

Ademais, foram realizadas análises moleculares de sequenciamento da região IG1 do DNA ribossomal (rDNA), com os *primers* 26SF e 5SR (Messias Silvestre et al., 2010). *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas para a validação dos antifúngicos empregados nas análises.

**Tabela 1.** Identificação e origem de isolamento das cepas de *Trichosporon* spp.

<b>Espécie</b>	<b>Códigos das cepas</b>	<b>Origem de isolamento</b>	<b>Código Genbank</b>
<i>T. inkin</i>	CEMM 05-6-074	Urina	JX124953
	CEMM 05-6-075	Área Perineal	JX124985
	CEMM 01-1-144	Superficial	JX124989.1
	CEMM 01-1-143	Superficial	JX125002.1
	CEMM 01-1-145	Urina	JX124958.1
	CEMM 03-1-073	Unha humana	MW291566
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	Urina	JX124945
	CEMM 05-6-073	Cateter	JX124961
	CEMM 03-1-072	Sangue Humano	MW291565
	CEMM 05-6-057	Piedra branca	HM46988.1
	80	Aspirado traqueal	MW291562
	81	Sangue	MW291563
	82	Escamas ungueais	MW291564
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	Escarro	-
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	Fezes	-

**Legenda:** ATCC=American Type Culture Collection.

### 5.3.2 Drogas utilizadas

Soluções estoques de **CsA**, Merck, EUA foram preparadas em água destilada estéril e testadas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL (Cordeiro et al., 2014). **AMB** (Sigma Chemical Co., EUA), **VRZ** (Pfizer, EUA) e **FLZ** (Pfizer, Brasil) foram preparados de acordo com o descrito no **item 5.2.9**.

Os antifúngicos foram testados nas seguintes concentrações: **AMB**, 10 µg/mL; **VRZ**, 50 µg/mL; **FLZ**, 64 µg/mL (Cordeiro et al., 2015). Diluições seriadas de duas vezes de cada fármaco foram realizadas em RPMI com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., EUA), tamponadas para pH 7,0 com MOPS 0,165 M (Sigma Chemical Co., EUA) (Cordeiro et al., 2015).

### 5.3.3 Efeito da *CsA* em células planctônicas de *Trichosporon spp.*

A suscetibilidade das cepas de *Trichosporon spp.* (n=13) frente à *CsA* na forma planctônica foi avaliada por meio do teste de microdiluição em caldo (CLSI, 2008), conforme descrito no **item 5.2.12**, em concentrações iniciais de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. O MIC para *CsA* foi definido como a menor concentração capaz de iniciar 50 % do crescimento fúngico visível de acordo com o protocolo de Shinde e colaboradores (2012).

### 5.3.4 Formação dos biofilmes

Baseou-se na metodologia estabelecida por Cordeiro et al., (2015) com adaptações, para avaliação da capacidade das cepas produzirem biofilmes, de acordo com o protocolo descrito no **item 5.2.8**.

### 5.3.5 Efeito da *CsA* na biomassa do biofilme e atividade metabólica

Os biofilmes foram formados em placas de poliestireno conforme descrito no **item 5.2.8**, utilizando RPMI suplementado com *CsA* (RPMI-*CsA*) a 50 µg/mL ou 100 µg/mL. Após o período de adesão, as células não aderentes foram removidas e as placas foram reincubadas em RPMI-*CsA* até que o biofilme atingisse a maturidade. Após esse período, os biofilmes foram avaliados quanto à biomassa pelo método de Cristal Violeta (Peeters et al., 2008) e atividade metabólica pelo ensaio de MTT (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018).

### 5.3.6 Efeito da *CsA* na tolerância de biofilmes a drogas antifúngicas

Biofilmes maduros formados em RPMI-*CsA* (50 µg/mL, 100 µg/mL) foram tratados com 10 µg/mL *AMB*, 50 µg/mL *VRZ* ou 64 µg/mL *FLZ* (Cordeiro et al., 2015) e incubados por mais 24 h, a 35°C. A atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes foram avaliadas conforme descrito acima (**item 5.3.4**). Biofilmes cultivados em RPMI sem *CsA* foram avaliados como controle de crescimento.

### 5.3.7 Efeito da *CsA* na ultraestrutura dos biofilmes

O efeito da *CsA* na estrutura do biofilme foi avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura, conforme descrito por Cordeiro et al. (2015). As cepas *T. inkin* CEMM 05-6-074 (urina) e *T. asahii* CEMM 05-6-072 (urina) foram escolhidas para análise por serem consideradas as melhores produtoras de biofilme. Os biofilmes foram formados em lâminas Thermanox® (Thermo Fisher Scientific, NY, EUA) depositadas em poços de placas de poliestireno com RPMI-*CsA* (100 µg/mL) e incubadas por 48 horas a 35 °C.

Após esse período, os biofilmes foram tratados com **AMB** (10 µg/mL), **VRZ** (50 µg/mL) ou **FLZ** (64 µg/mL). Após 24 horas de contato com os antifúngicos, os biofilmes foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M com azul de alcian 0,1% e incubados durante a noite a 4°C. As culturas foram então lavadas com tampão cacodilato 0,15 M por 5 min, desidratadas com concentrações crescentes de álcool [50, 70, 80, 95 e 100% (duas vezes para cada concentração e 10 minutos para cada processo)], secas com hexametildissilazano (*Polysciences Europe, Alemanha*) por 30 min e incubadas em um dessecador. As lâminas foram revestidas com ouro de 10 nm e observadas em um microscópio FEI Inspect S50 (FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA) em modo de alto vácuo a 15 kV. O *software Photoscape v3.6.5* (MooiiTech, República da Coreia) foi usado para compilar as imagens.

### 5.3.8 *Análises in silico*

#### 5.3.8.1 *Busca em banco de dados*

Os bancos de dados de proteínas Uniprot e PDB (Protein data bank) foram usados para a busca inicial de calcineurina fúngica e humana. Posteriormente, uma busca extensiva por sequências homólogas de calcineurina foi realizada usando ferramentas BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a partir das sequências modelo da subunidade A da calcineurina em *C. albicans* e humanos. Essas análises tiveram como objetivo buscar homólogos de calcineurina em genomas de *T. asahii* descritos na literatura com identidade de sequência maior que 60%. As ferramentas BLAST são usadas para estimar similaridades entre sequências biológicas e para buscar relações evolutivas em sequências e domínios de proteínas.

#### 5.3.8.2 *Modelagem molecular*

Inicialmente, a modelagem molecular da calcineurina foi realizada usando o servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). Posteriormente, os modelos mais promissores foram identificados e refinados usando o GalaxyRefine Server (<https://galaxy.seoklab.org/>). Antes e depois do refinamento, todos os modelos passaram por um rigoroso processo de validação pelo MolProbity para garantir sua confiabilidade (Chen et al., 2010).

### 5.3.8.3 Estudos de Docking Molecular

Para entender como a CsA se liga à calcineurina, usamos simulações de *docking* molecular usando os servidores DockThor (<https://dockthor.lncc.br/v2/>) e FRODOCK 2.0 (<https://frodock.iqf.csic.es/>). Para validar o servidor DockThor, o *re-docking* molecular também foi realizado após a separação dos complexos cristalizados da subunidade A da calcineurina em *C. albicans* e humanos, e então os testes foram realizados com o Dockthor. Após as simulações de *docking*, o software PDBsum, com sua ferramenta LigPlot integrada, foi usado para analisar as interações intermoleculares entre calcineurina e CsA. O PDBsum é um servidor web que fornece informações estruturais sobre entradas de banco de dados de proteínas (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>). As análises incluem estrutura secundária de proteína, interações proteína-ligante e proteína-DNA, análises PROCHECK. As estruturas 3D podem ser visualizadas interativamente em RasMol, PyMOL e um visualizador JavaScript chamado 3Dmol.js.

### 5.3.9 Análise estatística

A representação gráfica e as análises estatísticas foram conduzidas usando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os experimentos com biofilmes foram realizados em triplicata para cada condição, com pelo menos duas réplicas independentes para cada teste. Os dados foram analisados e comparados utilizando Anova e o teste T pareado, considerando valores  $< 0,05$  como significativos.

## 5.4 3ª PARTE EXPERIMENTAL – INIBIÇÃO DE Hsp90

### 5.4.1 *Microrganismos*

Utilizaram-se os mesmos microrganismos anteriormente descritos no **item 5.3.1**

### 5.4.2 *Drogas utilizadas*

A solução estoque de **RAD** (Sigma Chemical Co. EUA) 1000 mg/mL foi preparada em DMSO 50% diluída em água destilada estéril (Cordeiro et al., 2016), filtrada em 0,22 µm, armazenada a -20 °C, utilizado na concentração inicial de 25 µg/mL no ensaio planctônico e 62,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL frente aos biofilmes a depender da condição da etapa experimental. Soluções estoque de **AMB** (Sigma Chemical Co., EUA) foram utilizadas nas concentrações de 2 e 4 µg/mL e **VRZ** em 0,125 µg/mL

### 5.4.3 *Suscetibilidade planctônica à Radicicol*

A suscetibilidade das cepas de *Trichosporon* spp. (n=13) frente à **RAD** na forma planctônica foi avaliada por meio do teste de microdiluição em caldo (CLSI, 2008), como descrito no **item 5.2.12**. As concentrações que variaram de 1,25 µg/mL a 12,5 µg/mL. O MIC para **RAD** foi definido como a menor concentração capaz de inibir 100 % do crescimento fúngico visível (Cowen et al., 2009).

### 5.4.4 *Efeito da inibição de Hsp90 em biofilme maduro*

A metodologia de formação dos biofilmes seguiu como no **item 5.2.8**. Após as 48h de maturação, os biofilmes foram desafiados a **RAD** as concentrações de 62,5 µg/mL para *T. asahii* e 100 µg/mL para *T. inkin* (padronizadas baseando-se nos valores obtidos na forma planctônica) e incubados à 35°C durante 24h. Após esse período, os biofilmes foram avaliados quanto a atividade metabólica pelo de MTT (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018) e biomassa, pelo teste do Cristal Violeta (Peeters et al., 2008).

### 5.4.5 *Efeito da inibição de Hsp90 na tolerância do biofilme a drogas antifúngicas*

Biofilmes maduros (48h) foram expostos a menores concentrações de **RAD** – 6,25 µg/mL para *T. asahii* e 10 µg/mL para *T. inkin* – **AMB** – 4 µg/mL para *T. asahii* e 2 µg/mL para *T. inkin*, e **VRZ** 0,125 µg/mL para ambas as espécies (Cordeiro et al., 2015) durante um período de 24h, em seguida, submetidos aos testes de MTT (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018) e Cristal Violeta (Peeters et al., 2008).

#### 5.4.6 Efeito da inibição de Hsp90 em *Trichosporon* spp e tempo de morte de *G. mellonella*

Neste ensaio foram utilizadas duas cepas de *Trichosporon* spp - (*T. inkin*, CEMM 05-6-074 - urina; *T. asahii*, CEMM 05-6-072 - urina), consideradas as melhores formadoras de biofilme). Foram selecionadas 10 larvas de *G. mellonella* nos estágios 5 e 6 com peso (0,27g) e tamanhos (1,5 a 2 cm) semelhantes, por grupo de tratamento. Uma seringa Hamilton foi utilizada para injetar 10ul da suspensão de células fúngicas ( $4 \times 10^6$   $\mu\text{g/mL}$ ) na última proleg esquerda das larvas e incubadas a 37°C durante 3h. Para os grupos testes, após 3h, foi injetado 10ul de RAD (62,5  $\mu\text{g/mL}$  para *T. asahii* e 100  $\mu\text{g/mL}$  para *T. inkin*) na última proleg direita das larvas na qual, foram transferidas para placas de petri identificadas e incubadas a 37°C cobertas com papel alumínio durante o período de cinco dias. Foram avaliados diariamente as atividades de movimentação, formação de casulo, melanização e sobrevivência.

Dois grupos foram inseridos no ensaio: controle positivo com AMB (4  $\mu\text{g/mL}$  em *T. asahii* e 2  $\mu\text{g/mL}$  em *T. inkin*) ou VRZ (0,125  $\mu\text{g/mL}$  e controle negativo com PBS estéril.

#### 5.4.7 Efeito de RAD na ultraestrutura dos biofilmes

O efeito da RAD na estrutura do biofilme foi avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura, conforme a metodologia descrita no item 5.3.7. Após o processo de maturação os biofilmes foram tratados com RAD (6,25  $\mu\text{g/mL}$  e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) AMB (2  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$ ), VRZ (0,125  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 5.4.8 Análise Estatística

A representação gráfica e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os experimentos com biofilmes foram realizados em triplicata para cada condição, com pelo menos duas réplicas independentes para cada teste. Os dados foram analisados e comparados por meio de Anova e o teste t pareado, considerando valores  $< 0,05$  como significativos.

As curvas de sobrevivência de *G. mellonella* foram criadas por meio do método de Kaplan-Meier e a análise estatística foi realizada utilizando o teste de log-rank

(Mantel-Cox). As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism e o nível de significância foi definido como  $p < 0,05$ .

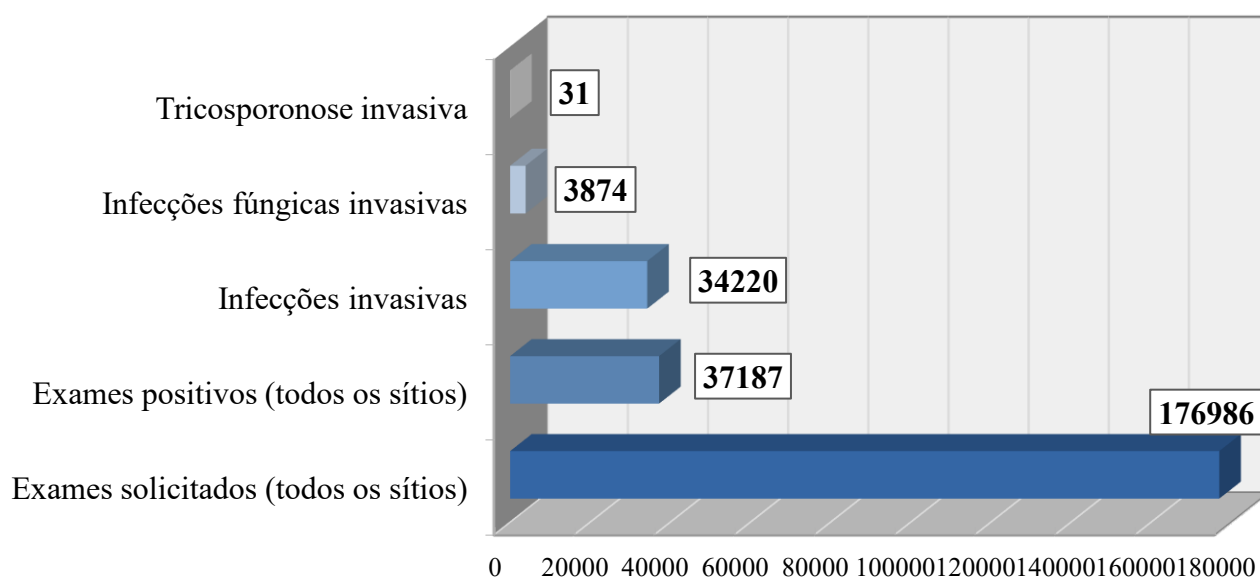
## 6 RESULTADOS

### 6.1 1ª PARTE EXPERIMENTAL – ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO

#### 6.1.1 Panorama dos exames

Nos cenários dos exames (**figura 9**), houve 176.986 exames solicitados, 37.187 exames positivos para bactérias e fungos. Destes, 34.220 exames positivos eram oriundos de infecções invasivas. 3.874 isolados foram positivos para fungos, e a pesquisa contou com 28 isolados de interesse (identificação presuntiva pelo equipamento VITEK® 2 Compact – bioMérieux como *T. asahii*).

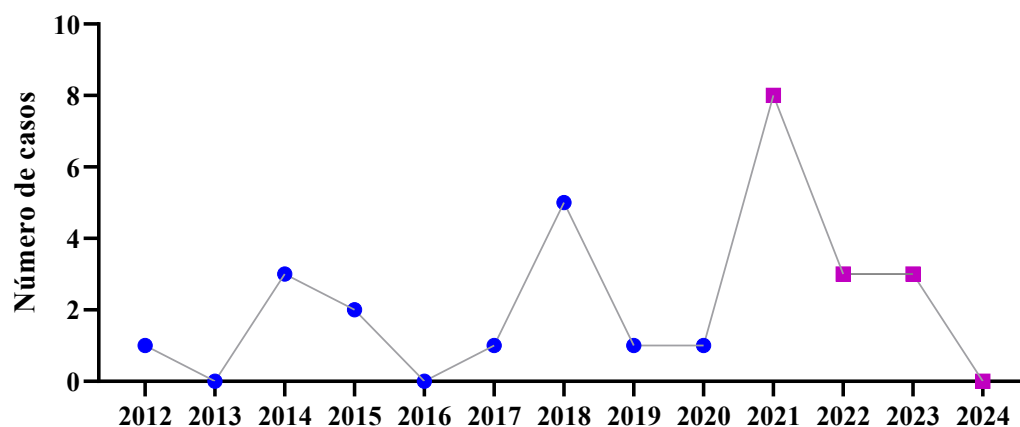
**Figura 9.** Panorama dos exames (de 07/08/2012 a 05/10/2023)



### 6.1.2 Divisão do estudo

Durante o estudo foram encontrados n=14 casos prováveis retrospectivos, dentre os anos de 2012 a agosto de 2020 e n=14 casos prováveis prospectivos, dentre os anos de setembro de 2020 a 2024 (**gráfico 1**).

**Gráfico 1.** Casos prováveis de *Trichosporon* spp. retrospectivos e prospectivo entre os anos de 2012 a 2024.



### 6.1.3 Distribuição sociodemográfica

No que diz respeito a idade (anos), das 28 cepas caracterizadas como *T. asahii* apresentou maior prevalência ocorreu em crianças da faixa etária de 2 anos até < 12 anos (n=13), seguindo de adolescente de 12 a 18 anos (n=7), e o público infantil de 1 mês até < 2 anos (n=6). A menor prevalência foi demonstrada em neonatos nascido < 1 mês (n=2). A média aritmética da idade dos pacientes da pesquisa foi de 6 anos, 6 meses e 03 dias (**tabela 2**).

No aspecto do sexo dos pacientes, predominou-se o público masculino com n=17 dos pacientes e o sexo feminino com n= 11.

**Tabela 2.** Idade dos pacientes da pesquisa

Idade (anos)	Total	Desfecho	
		Alta	Óbito
Criança (2 anos até < 12 anos)	13	7	6
Adolescente (12 anos até 18 anos)	7	4	3
Infantil (1 mês até < 2 anos)	6	5	1
Neonato (nascido < 1 mês)	2	0	2
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>16</b>	<b>12</b>

Ao desfecho em relação ao sexo dos pacientes, dos 17 pacientes do sexo masculino, n=12 receberam alta e n=5 foram a óbito, para o sexo feminino de 11 pacientes, n=4 receberam alta e n=7 foram a óbitos, assim, evidenciando maiores índices de alta no público masculino e óbito para o público feminino.

#### **6.1.4 Distribuição por unidade hospitalar**

Ao analisar a detalhada distribuição dos espécimes clínicos dos isolados de interesse por unidade hospitalar, observou-se uma significativa proporção proveniente de determinadas unidades: UTI (n=19), enfermarias (n=7), centro cirúrgico (n=1), emergência/ observação (n=1) (**Tabela 3**).

Ao desfecho, os pacientes provenientes da UTI: alta (n=8) óbito (n=11); Enfermarias: alta (n=6) óbito (n=1); centro cirúrgico: alta (n=1) e emergência/observação: alta (n=1).

**Tabela 3.** Distribuição dos espécimes clínicos dos isolados de interesse por unidade hospitalar

Origem	Total (n)	Desfecho	
		Alta (n)	Óbito (n)
Unidade de Terapia Intensiva (UTI)	19	8*	11*
Enfermaria	7	6	1
Centro cirúrgico	1	1	0
Emergência/ Observação	1	1	0
<b>Tempo de internação (meses)<sup>a</sup></b>	2,19±1,35	2,13 ±0,99	2,27 ±1,74

**Legenda:**\*Significância estatística ( $p < 0,05$ )

Média ± desvio padrão

UTI = Unidade de Terapia Intensiva

**6.1.5 Motivos dos atendimentos**

Nas características que representam o motivo do atendimento, em suma, os 28 pacientes que compõe a pesquisa apresentaram ao total, 62 motivos, destes, temos doenças de bases associadas ou não a sintomatologias que agravaram o quadro infeccioso, e sintomatologias que corroboram com o quadro clínico. Para tais, foram agrupados em: problemas neurológicos (n=11), câncer (n=9), febre (n=8), problemas respiratórios (n=7), infecções (n=6), problemas cardiovasculares (n=3) e outros (n=18) (**Tabela 4**).

Ao desfecho, dos pacientes que deram entrada no atendimento com problemas neurológicos: alta (n=6) óbito (n=5); câncer: alta (n=3) óbito (n=6); febre: alta (n=6) óbito (n=2); problemas respiratórios: alta (n=5) óbito (n=2); infecções: alta (n=3) óbito (n=3); problemas cardiovasculares: alta (n=2) óbito (n=1); e outros motivos: alta (n=10) óbito (n=8);

**Tabela 4.** Motivos dos atendimentos

Motivos dos atendimentos	Total (n)	Desfecho	
		Alta (n)	Óbito (n)
Problemas neurológicos <sup>a</sup>	11	6	5
Câncer <sup>b</sup>	9	3	6
Febre	8	6	2
Problemas respiratórios <sup>c</sup>	7	5	2
Infecções <sup>d</sup>	6	3	3
Problemas cardiovasculares <sup>e</sup>	3	2	1
Outros <sup>f</sup>	18	10	8

**Legenda:**

- a. AVE hemorrágico, Choque neurogênico, Crises convulsivas, Doença desmielinizante do Sistema Nervoso Central (Síndrome de ADEM), Empiema subdural, Encefalopatia, Microcefalia, Mielomeningocele, Paralisia Cerebral, Polirradiculoneurite e Síndromes epiléticas.
- b. aplasia medular, ependimoma refratário, leucemia linfóide aguda, leucemia mieloide aguda, meduloblastoma, neuroblastoma, raddomiossarcoma, tumor abdominal pélvico e ovariano e tumor hepático: hepatoblastoma.
- c. Derrame pleural, Dispneia, Pneumonia, Síndrome respiratória gripal, Metástase pulmonar.
- d. Choque piogênico, Choque séptico, Dengue grave, Hepatite A, Infecção urinária e pancreatite.
- e. Choque hemorrágico, Insuficiência cardíaca e Hipertensão.
- f. Abscesso Cerebral, Anemia, Bexiga Neurogênica, Colite Pseudomembranosa, Desnutrição, Diabetes, Doença de refluxo gastroesofágico, Doença renal crônica, Escabiose, Escabiose, Hiperglicemia, Hipotireoidismo, Ictericia, Insuficiência renal aguda, Lesão hepática, Megacolon Congênito, Neutropenia, Pancitopenia, Pancreatite Necrohemorrágica, Prematuridade e desnutrição severa, Sepsis, Síndrome de Beckwith – Wiedemann, Síndrome de Down, Síndrome nefrótica corticorresistente, Urosepsis e Vômito com sangue.

### ***6.1.6 Uso de dispositivos médicos invasivos até a detecção do isolado de interesse***

A respeito do uso de dispositivos médicos invasivos pelos pacientes da pesquisa até a detecção do isolado de interesse, obteve-se como resultado o total de 18 dispositivos englobando todos os pacientes do estudo.

Os dispositivos mais frequentes foram: sonda para alimentação (n=22), cateter venoso central (n=21), cateter intravenoso (n=12), sonda vesical de demora (n=11), tubo endotraqueal orotraqueal (n=10), cânula de traqueostomia (n=6) e outros (n=11) (**Tabela 5**).

Ao desfecho, os pacientes que fizeram uso de sonda para alimentação: alta (n=14) óbito (n=8); cateter venoso central: alta (n=12) óbito (n=9); cateter intravenoso: alta (n=7)

óbito (n=5); sonda vesical de demora: alta (n=6) óbito (n=5); tubo endotraqueal e orotraqueal: alta (n=3) óbito (n=7); cânula de traqueostomia: alta (n=2) óbito (n=4); e outros: alta (n=8) óbito (n=3);

**Tabela 5.** Dispositivos médicos utilizados até a data do isolado de interesse

Dispositivos Médicos	Total (n)	Desfecho	
		Alta (n)	Óbito (n)
Sonda para alimentação	22	14	8
Cateter Venoso Central	21	12	9
Cateter intravenoso	12	7	5
Sonda Vesical de Demora	11	6	5
Tubo Endotraqueal e Orotraqueal	10	3	7
Cânula de Traqueostomia	6	2	4
Outros <sup>a</sup>	11	8	3

**Legenda:**

- a. Cateter nasal, cateter de hemodiálise, sonda de gastrostomia (GTM ou GTT), cateter dreno de tórax, ileostomia, bolsa de colostomia, toracocentese e laparotomia.

**6.1.7 Isolados a partir dos espécimes clínicos**

*T. asahii* foi isolado principalmente de urina (n=15), sangue total a partir de hemocultura (n=6), ponta de cateter (n=5), seguido de sangue de cateter venoso central (n=2) e líquido peritoneal (n=1), os quais foram relacionados ao desfecho clínico. Vale ressaltar que um paciente (26R) apresentou o mesmo microrganismo isolado de dois sítios distintos na mesma data de coleta: sangue total e líquido peritoneal (**Tabela 6**).

Ao desfecho, os isolados provenientes de urina: alta (n=9) óbito (n=5); sangue total (hemocultura): alta (n=3) óbito (n=3); ponta de cateter: alta (n=2) óbito (n=3); sangue de cateter venoso central: alta (n=1) óbito (n=1); e líquido peritoneal: óbito (n=1) (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Espécimes clínicos positivos ao isolamento de *T. asahii*

Espécie clínico	Total (n)	Desfecho	
		Alta (n)	Óbito (n)
Urina	15	10	5
Sangue total (hemocultura)	6	3	3
Ponta de cateter	5	2	3
Sangue de cateter venoso central (CVC)	2	1	1
Líquido peritoneal	1	0	1

**Legenda:**

CVC = Cateter Venoso Central

**6.1.8** *Uso de antimicrobianos e outras classes condicionantes de interesse*

A análise do uso de antimicrobianos (n=106) e/ou outros condicionantes (n=33), usados pelo menos 48 horas antes da detecção fúngica, mostrou que os pacientes fizeram uso de vários medicamentos: antibacterianos (n=21), outros condicionantes de interesse (n=21), antifúngicos (n=5) e antiparasitários (n=1) – dentre o total de pacientes deste estudo (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Uso de Antimicrobianos e outras classes condicionantes

Classe de antimicrobianos e outras classes condicionantes de interesse	Total
Antibacterianos	21
Antifúngicos	5
Antiparasitários	1
Outas classes condicionantes de interesse	21

**Legenda:**

- a. Anticonvulsivantes, anti-inflamatórios, corticoides e medicamento utilizados para o tratamento de pacientes oncológicos.

Destes, com maior utilização pelos pacientes da pesquisa: os antibacterianos – vancomicina (n=18), meropenem (n=16) e amicacina (n=8), teicoplanina (n=8), cefepime (n=5), micafungina (n=4), ceftriaxona (n=4), tazocim (n=4), ciprofloxacino (n=3) e outros (n=18).

Ao desfecho, paciente em uso de vancomicina: alta (n=9) óbito (n=9); meropenem: alta (n=6) óbito (n=10); amicacina: alta (n=4) óbito (n=4); teicoplanina: alta (n=2) óbito (n=6); cefepime: alta (n=4) óbito (n=1); micafungina: alta (n=2) e óbito (n=2); ceftriaxona: alta (n=2) e óbito (n=2); tazocim: alta (n=2) e óbito (n=2); ciprofloxacino: alta (n=2) e óbito (n=1); e outros: alta (n=10) e óbito (n=8) (**Tabela 8**).

Foi identificada significância estatística dos pacientes que utilizam meropenem, os quais obtiveram maior índice de óbito (n=10) e alta hospitalar (n=6).

**Tabela 8.** Desfecho com base no uso dos antimicrobianos

Antimicrobianos	Total (n)	Desfecho	
		Alta (n)	Óbito (n)
Vancomicina	18	9	9
Meropenem	16	<b>6*</b>	<b>10*</b>
Amicacina	8	4	4
Teicoplanina	8	2	6
Cefepime	5	4	1
Micafungina	4	2	2
Ceftriaxona	4	2	2
Tazocim	4	2	2
Ciprofloxacina	3	2	1
Outros antimicrobianos <sup>a</sup>	18	10	8

**Legenda:**

\*Significância estatística (p<0,05)

a. Fluconazol, anfotericina B, ceftazidima, nistatina, azitromicina, cefalexina, gentamicina, metronidazol, voriconazol, clindamicina, levofloxacina, oxacilina, polimixina B, linezolid, ampicilina, cefazolina, penicilina e bacitracim.

No que diz respeito aos pacientes que utilizaram mais de um antimicrobiano e/ou outro condicionante, dos 28 pacientes positivos para *T. asahii*, 27 pacientes fizeram uso de antimicrobianos, assim: 8 pacientes fizeram o uso de quatro antimicrobianos diferentes, 8 pacientes usaram três, 7 pacientes usaram dois, 3 pacientes usaram cinco, 2 pacientes usaram de seis, 1 paciente utilizou oito e 1 paciente utilizou um.

No que diz respeito aos outros condicionantes de interesse: 6 pacientes fizeram o uso de apenas uma droga condicionante de interesse, 4 pacientes usaram três, 4 pacientes usaram dois e 1 paciente utilizou sete.

Salienta-se, a triagem que investigou o uso de qualquer antibiótico associado ao isolamento de *T. asahii* em sítio profundo. Foram considerados materiais profundos: urina, sangue de cateter, ponta de cateter, sangue total (hemocultura) e líquido peritoneal. Assim, 27/28 pacientes representam esse grupo, onde foram identificados em maior uso a vancomicina (n=18), seguido de meropenem (n=16), amicacina (n=8), como representadas na tabela acima.

#### **6.1.9 Coinfecção**

Na detecção concomitante (co-infecção) de *T. asahii* a outros microrganismos em mesmo período, foram estudadas com relação ao total de isolados de interesse da pesquisa (n=28), destes, 12 pacientes foram diagnosticados nesta condição, com a presença de dois ou mais agentes associados a *Trichosporon* spp.

Os outros principais microrganismos identificados em associação a *T. asahii* foram os agentes bacterianos: *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridioides difficile*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*; fungos: *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *Candida* sp e um parasita *Giardia lamblia* (**Tabela 9**).

Tabela 9. Detecção concomitante de *T. asahii* e outros microrganismos.

Caso	Sítio de isolamento de <i>T. asahii</i>	Coinfecção		
		Microrganismo (s)	Sítio de isolamento	Desfecho
1	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ponta de cateter	Óbito
2	Urina	<i>Clostridioides difficile</i>	Fezes	Alta
3	Urina	<i>Candida glabrata</i>	Urina	Óbito
4	Urina	<i>Candida tropicalis</i>	Sangue de CVC	Óbito
		+ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	e PICC + Hemocultura	
5	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hemocultura	Alta
		+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+ Ponta de cateter	
6	Urina	<i>Candida tropicalis</i>	Aspirado traqueal	Alta
7	Ponta de cateter	<i>Giardia lamblia</i>	Fezes	Óbito
8	Sangue de hemocultura	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Urina	Alta
9	Ponta de cateter	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hemocultura	Alta
		+ <i>Candida sp</i>	+ urina	
10	Urina	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultura	Alta
11	Sangue de hemocultura	<i>T. asahii</i>	Hemocultura	Óbito
	+ Líquido peritoneal	+ <i>S. epidermidis</i>	+ Líquido peritoneal	
12	Ponta de cateter	<i>T. asahii</i> + <i>Pseudomonas sp</i>	Ponta de cateter	Alta

### 6.1.10 Medidas de intervenção/tratamento

Nas medidas de intervenção/tratamento dos pacientes, evidenciou-se mais de um manejo ou medidas de intervenção/tratamento em um mesmo paciente, como também, nos demais.

Detalhe-se que, as principais medidas de intervenção/tratamento foram: utilizar apenas medicação (n=19), uso de medicação e retirada de SVD (n=4), uso de medicação e retirada cirúrgica de tumor (n=1), uso de medicação e retirada de PICC (n=1), retirada de SVD (n=1) e uso de medicação e retirada de AVC (n=1) (**Tabela 10**).

**Tabela 10.** Tipos de medidas de intervenção/tratamento

Tipos de medidas de intervenção	Número de pacientes
Uso de medicação	19
Uso de medicação e retirada de SVD	4
Uso de medicação e retirada cirúrgica de tumor	1
Uso de medicação e retirada de PICC	1
Retirada de SVD	1
Uso de medicação e retirada de AVC	1
<b>Total de medidas de intervenção/tratamento</b>	<b>27</b>

**Legenda:**

SVD = Sonda Vesical de Demora

PICC = Cateter Venoso Central de Inserção Periférica

AVC = Acesso Venoso Central

Em relação ao tratamento medicamentoso, as principais drogas utilizadas foram: **FLZ** (n=11), micafungina (n=7), **AMB** (n=7), **VRZ** (n=2), nitrofurantoina (n=1), tazocim (n=1), sulfametoxazol + trimetropim (n=1) e cefepime (n=1) (**Tabela 11**).

Ao desfecho, pacientes que fizeram o uso de: **FLZ**, n=8 receberam alta e n=3 foram à óbito; micafungina: alta n=4, óbito n=3; **AMB**: alta n=1, óbito n=6; nitrofurantoina: óbito n=1; **VRZ**: óbito n=2; tazocim: alta n=1; sulfametoxazol + trimetoprima: óbito n=1 e cefepime: alta n=1. Foi evidenciado significância estatística em pacientes ao uso de **AMB**.

**Tabela 11.** Medicações utilizadas no tratamento e desfecho clínico

Tratamento	Total (n)	Desfecho	
		Alta (n)	Óbito (n)
Fluconazol	11	8	3
Micafungina	7	4	3
Anfotericina B	7	<b>1*</b>	<b>6*</b>
Voriconazol	2	0	2
Nitrofurantoína	1	0	1
Tazocim	1	1	0
Sulfametoxazol + Trimetoprima	1	0	1
Cefepime	1	1	0

**Legenda:**

\*Significância estatística (p&lt;0,05)

No que diz respeito a combinação de tratamento dos pacientes da pesquisa com o uso de antimicrobianos, verifica-se o seguinte desfecho: **FLZ** - alta, n=5, óbito, n=3; Fluconazol + Tazocin – alta, n=1, óbito, n=0; **FLZ**+ Micafungina – alta, n=2; óbito=0; Anfotericina **AMB** – alta, n=1; óbito, n=3; **AMB** + micafungina – alta, n=0, óbito, n=2; **AMB** + Micafungina + **VRZ** – alta, n=0; óbito, n=1; **VRZ** – alta, n=0, óbito, n=1; **VRZ** + Micafungina – alta, n=0, óbito, n=1; Micafungina – alta, n=1, óbito, n=0; Sulfametoxazol + trimetropima + nitrofurantoína – alta, n=0, óbito, n=1; Cefepime – alta, n=1, óbito, n=0 (**tabela 12**).

**Tabela 12.** Desfecho dos pacientes do estudo por droga(s) durante o tratamento.

Tratamento		Desfecho	
Medicamento(s)	Número de pacientes	Alta	Óbito
Fluconazol	8	5	3
Fluconazol + tazoclin	1	1	0
Fluconazol + micafungina	2	2	0
Anfotericina B	4	1	3
Anfotericina B + micafungina	2	0	2
Anfotericina B + micafungina + voriconazol	1	0	1
Voriconazol	1	0	1
Voriconazol + micafungina	1	0	1
Micafungina	1	1	0
Sulfa+trimetropin + nitrofurantoína	1	0	1
Cefepime	1	1	0

#### **6.1.11 Compilado do desfecho clínico dos pacientes**

Nas categorias de atendimento dos pacientes acometidos por *T. asahii* em sítios profundos, evidenciou-se alta hospitalar (n=16) e óbito (n=12).

### 6.1.12 Caracterização dos isolados da pesquisa

Na caracterização dos isolados da pesquisa, todos os isolados representam *T. asahii* identificados por dispositivo VITEK® 2 Compact – bioMérieux (**tabela 13**).

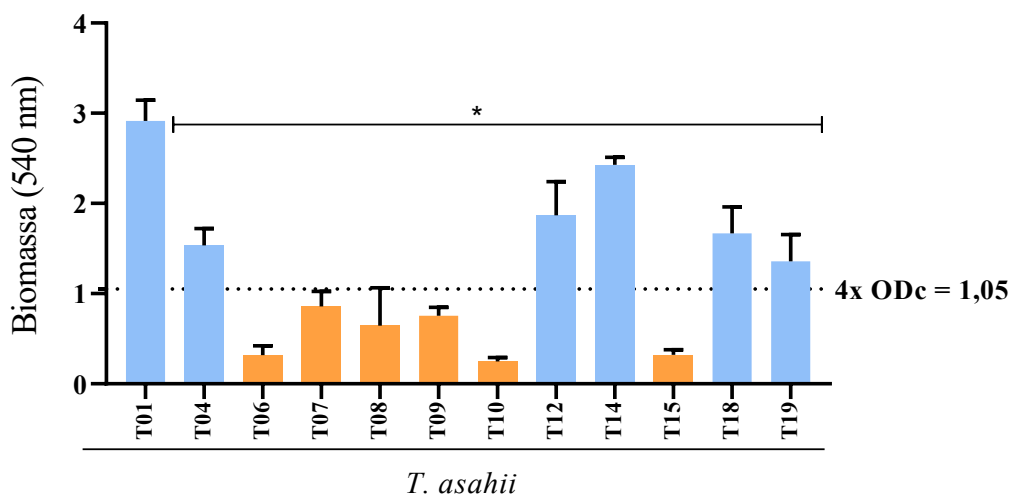
**Tabela 13:** Identificação presuntiva das cepas de *Trichosporon asahii* por VITEK®

Espécie	Códigos das cepas	Sítio de isolamento
<i>T. asahii</i>	T 01	Urina
	T 04	Urina
	T 06	Urina
	T 07	Urina
	T 08	Urina
	T 09	Urina
	T 10	Urina
	T 12	Urina
	T 14	Urina
	T 15	Ponta de cateter
	T 18	Hemocultura
	T 19	Sangue de cateter venoso central

### 6.1.13 Formação dos biofilmes

Das doze cepas testadas de *T. asahii*, seis foram classificadas como fortes formadoras de biofilmes (T01, T04, T12, T14, T18 e T19) e seis como moderadas formadoras (T06, T07, T08, T09, T10 e T15), como representado no gráfico abaixo (**Figura 10**).

**Figura 10.** Capacidade de formação de biofilmes das cepas de *T. asahii* utilizadas neste estudo.



**Legenda:**

1. Barras azuis representam as cepas de *T. asahii* fortes produtoras de biofilmes.
2. Barras laranjas representam as cepas de *T. asahii* moderadas produtoras de biofilmes
3. O cut-off que classifica as cepas em fortes produtoras de biofilme, está representando pela linha pontilhada.
4. O \* representa diferença estatística significativa entre a cepa T01 quando comparada as demais.

#### 6.1.14 Determinação de concentração inibitória mínima

A **tabela 14** apresenta os valores e intervalos de CIM planctônicas e em biofilmes (CIMB) para os antifúngicos **AMB**, **VRZ** e **FLZ** sobre os isolados de *T. asahii*. Para **AMB** variaram de 1 a 64µg/mL e CIMB 8 a 128 µg/mL, para **VRZ** CIM de 0,06 a 4µg/mL e CIMB de 64 a >128 µg/mL e **FLZ** CIM de 0,5 a 4 µg/mL e CIMB de 64 a >128 µg/mL, de acordo com o CLSI (2008). Durante a leitura do teste foi levado em consideração 100% de inibição para **AMB** e 50% de inibição para os azólicos (**Tabela 14**).

**Tabela 14.** Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória do Biofilme (CIMB) de **AMB**, **VRZ** e **FLZ** em isolados clínicos de *T. asahii* (n=12).

<i>T. asahii</i>	<b>AMB</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )		<b>VRZ</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )		<b>FLZ</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	CIM*	CIMB**	CIM*	CIMB**	CIM*	CIMB**
T01	2	64	2	> 128	4	> 128
T04	16	128	4	> 128	2	128
T06	2	32	2	128	4	>128
T07	2	32	2	64	4	64
T08	16	128	2	> 128	4	> 128
T09	64	128	0,06	> 128	2	> 128
T10	8	16	0,5	64	4	> 128
T12	1	8	0,06	128	2	128
T14	1	8	0,06	> 128	4	> 128
T15	8	32	2	> 128	4	> 128
T18	16	64	4	> 128	0,5	> 128
T19	4	32	4	128	0,5	128

**Legenda:**

\*100% de inibição

\*\* 50% de inibição

A CIM da *C. krusei* ATCC 6258 variou de 1 a 2  $\mu\text{g/ml}$  para **AMB** e de 32 a 64  $\mu\text{g/ml}$  para **FLZ**. A CIM da *C. parapsilosis* ATCC 22019 variou de 0,5 a 2  $\mu\text{g/ml}$  para **AMB** e de 1 a 2  $\mu\text{g/ml}$  para **FLZ**

CIM = Concentração inibitória mínima

CIMB = Concentração inibitória mínima nos biofilmes

**AMB** = Anfotericina B

**VRZ** = Voriconazol

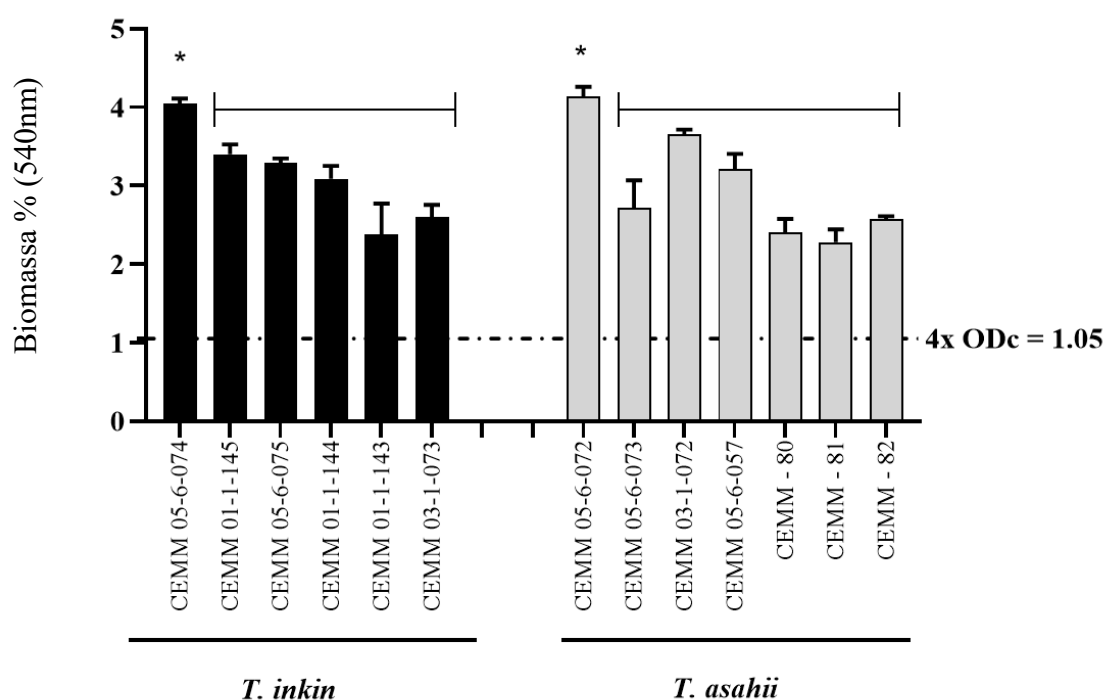
**FLZ** = Fluconazol

## 6.2 2ª PARTE EXPERIMENTAL – INIBIÇÃO DE CALCINEURINA

### 6.2.1 Formação dos biofilmes

Todas as cepas de *T. inkin* e *T. asahii* foram classificadas como fortes produtoras de biofilme (**Figura 11**). A maior produção de biomassa foi observada nos biofilmes de *T. inkin* CEMM 05-6-074 (urina) e *T. asahii* CEMM 05-6-072 (urina) ( $p < 0,05$ ) (**Figura 11**).

**Figura 11.** Capacidade de formação dos biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii*



**Legenda:** As linhagens *T. inkin* (barras pretas) e *T. asahii* (barras cinzas). O ponto de corte que classifica as linhagens como fortes produtoras de biofilme é representado pela linha pontilhada. *T. inkin* CEMM 05-6-074 e *T. asahii* CEMM 05-6-072 apresentaram a maior produção de biomassa, quando comparadas às outras linhagens da mesma espécie ( $p < 0,05$ ). \* representa diferença estatística entre a primeira coluna e as demais.

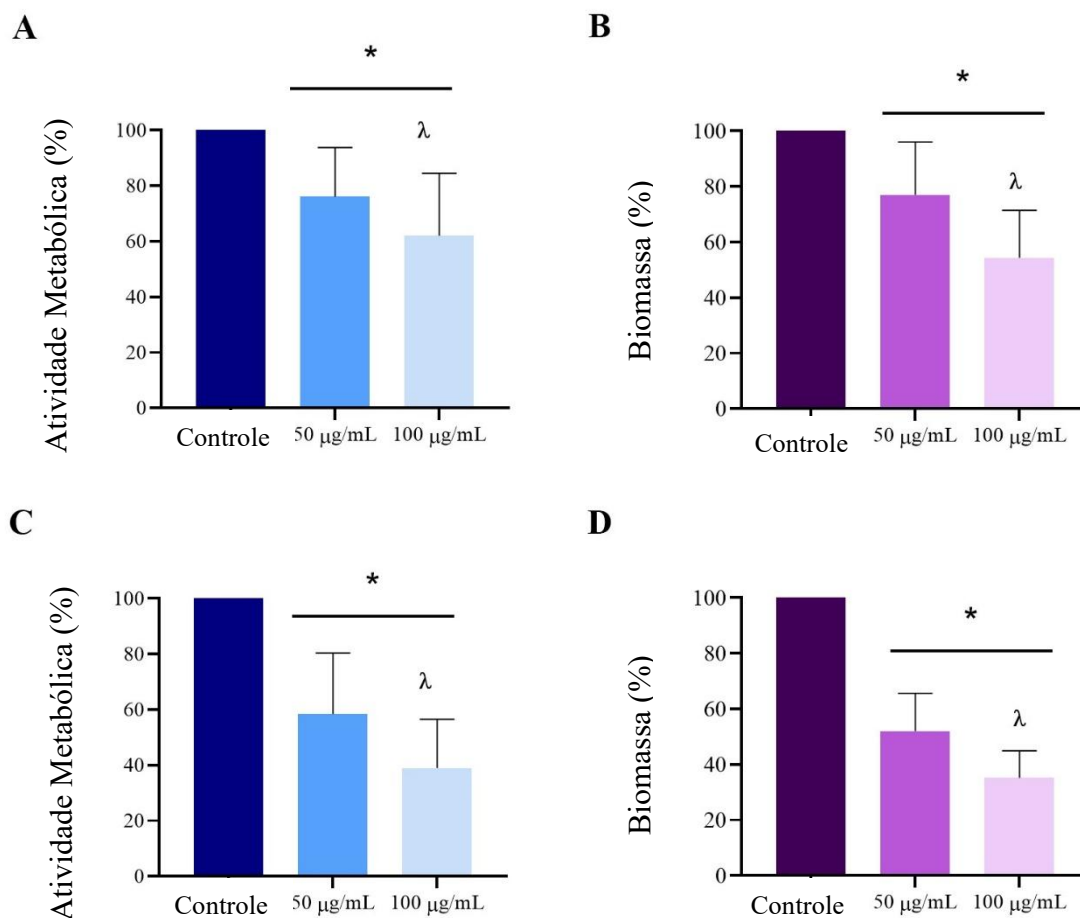
### 6.2.2 *CsA* em células planctônicas

Nas concentrações testadas de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL as *CsA* não foi capaz de inibir o crescimento planctônico de *T. inkin* e *T. asahii*.

### 6.2.3 **CsA** reduz biomassa e atividade metabólica de biofilmes de *T. asahii* e *T. inkin*

**CsA** foi capaz de reduzir significativamente a atividade metabólica e a biomassa de biofilmes maduros de *T. inkin* e *T. asahii*  $p < 0,05$  (**Figura 12**). **CsA** a 50  $\mu\text{g/mL}$  reduziu a biomassa de biofilmes de *T. inkin* em 26% (**Figura 12A**) e a atividade metabólica em 35% (**Figura 12C**). Biofilmes de *T. inkin* formados em RPMI-**CsA** 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram redução de 53% na biomassa (**Figura 12A**) e na atividade metabólica (**Figura 12C**). **CsA** a 50  $\mu\text{g/mL}$  reduziu a biomassa em 45% (**Figura 12B**) e a atividade metabólica em 34% em biofilmes de *T. asahii* (**Figura 12D**). Biofilmes maduros de *T. asahii* formados em RPMI-**CsA** 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram redução de 58% na biomassa (**Figura 12B**) e redução de 47% na atividade metabólica (**Figura 12D**).

**Figura 12.** Efeito da **CsA** na biomassa e atividade metabólica em *T. inkin* e *T. asahii*.



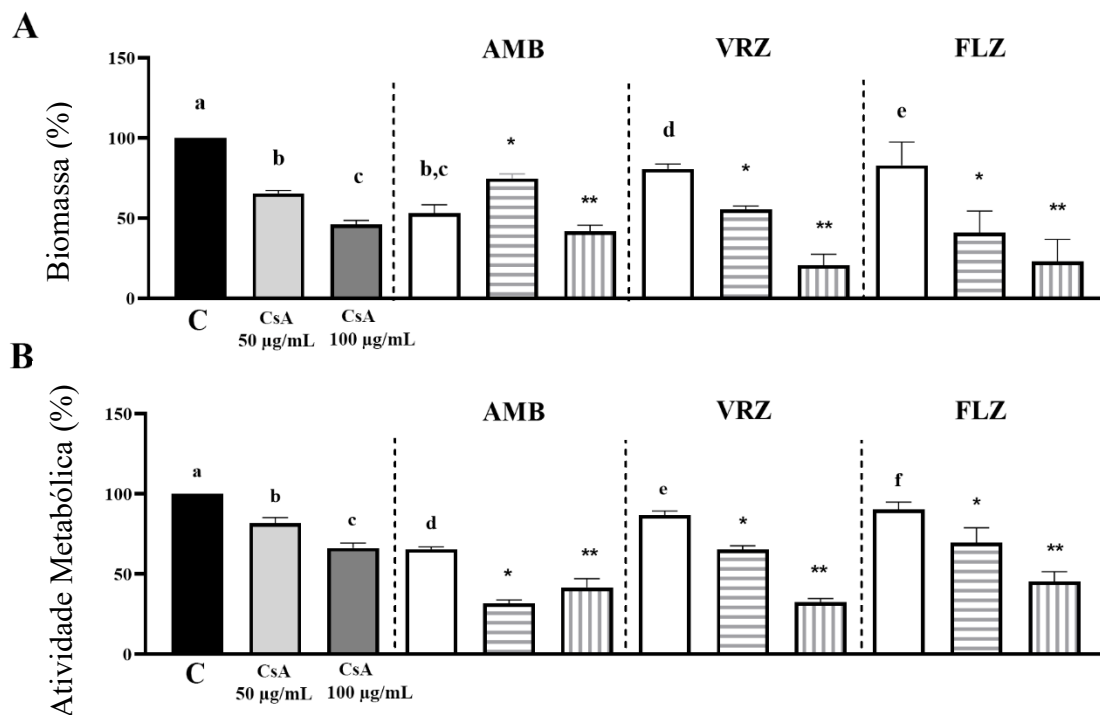
**Legenda:** *T. inkin* (A, B) e *T. asahii* (C, D). Biofilmes foram formados em RPMI (controle, barras escuras) ou RPMI-**CsA** a 50 µg/mL e 100 µg/mL e analisados quanto à atividade metabólica (azul) e biomassa (violeta). \*Diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao respectivo controle sem fármaco ( $p < 0,05$ ).  $\lambda$  Diferenças estatisticamente significativas entre as duas concentrações testadas ( $p < 0,05$ ).

#### 6.2.4 Biofilmes formados com **CsA** aumentam a sensibilidade de biofilmes de *T. inkin* a antifúngicos

Os biofilmes de *Trichosporon* spp. formados em RPMI-**CsA** mostraram maior suscetibilidade a **AMB**, **VRZ** e **FLZ** em comparação aos biofilmes de controle formados em RPMI sem suplementação ( $p < 0,05$ ), conforme mostrado nas **Figuras 13 e 14**.

**VRZ** e **FLZ** foram capazes de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a biomassa de biofilmes de *T. inkin* formados em RPMI-**CsA** (50 µg/mL, 100 µg/mL), em comparação aos biofilmes maduros formados em RPMI e tratados apenas com **CsA** ou antifúngicos (**Figura 13A**). **AMB**, **VRZ** e **FLZ** foram capazes de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade metabólica de biofilmes cultivados em RPMI-**CsA** em comparação aos biofilmes maduros de RPMI tratados apenas com **CsA** ou antifúngicos (**Figura 13B**).

**Figura 13.** Efeito da ciclosporina A (CsA) na sensibilidade de biofilmes de *T. inkin* a antifúngicos.

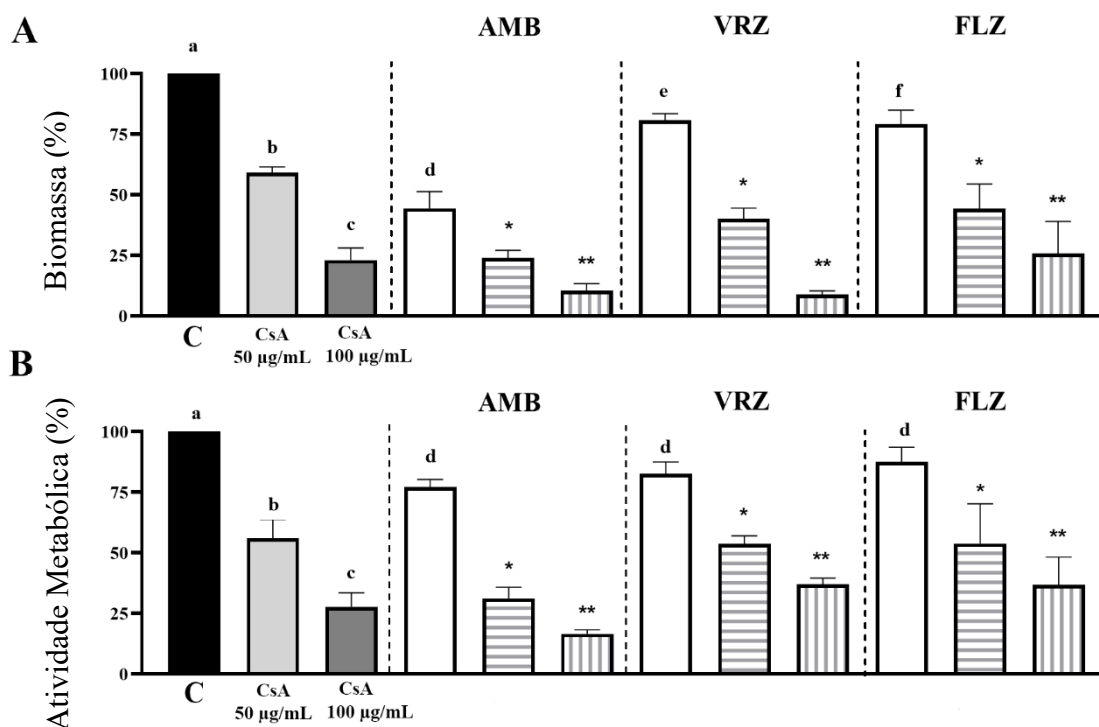


**Legenda:** Os biofilmes de *T. inkin* (n=6) foram formados em RPMI-CsA e então desafiados com AMB, VRZ ou FLZ. As linhas de padrão horizontal indicam biofilmes cultivados em 50 µg/mL de RPMI-CsA e posteriormente desafiados com antifúngicos; as linhas de padrão verticais indicam biofilmes cultivados em 100 µg/mL de RPMI-CsA e desafiados com antifúngicos. As barras de cor sólida indicam biofilmes maduros tratados com CsA ou antifúngicos. Os controles foram formados por biofilmes cultivados em RPMI sem CsA. As barras com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (\*) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre cada grupo antifúngico RPMI-CsA(50 µg/mL) e biofilme maduro tratado com 50 µg/mL de CsA sozinho (barra cinza claro). (\*\*) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre cada grupo antifúngico RPMI-CsA(100 µg/mL) e biofilme maduro tratado com 100 µg/mL de CsA sozinho (barra cinza escuro).

### 6.2.5 Biofilmes formados com CsA aumentam a sensibilidade de biofilmes de *T. asahii* a antifúngicos

AMB causou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) tanto na biomassa (Figura 14A) quanto na atividade metabólica (Figura 14B) dos biofilmes de *T. asahii* formados em RPMI-CsA (50 µg/mL, 100 µg/mL), em comparação aos biofilmes maduros cultivados em RPMI tratados com CsA ou AMB sozinho. VRZ e FLZ reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) a biomassa dos biofilmes de *T. asahii* formados em RPMI-CsA, em comparação aos biofilmes maduros cultivados em RPMI e tratados com CsA ou antifúngicos sozinhos (Figura 14A).

**Figura 14.** Efeito da ciclosporina A (CsA) na sensibilidade de biofilmes de *T. asahii* a antifúngicos.

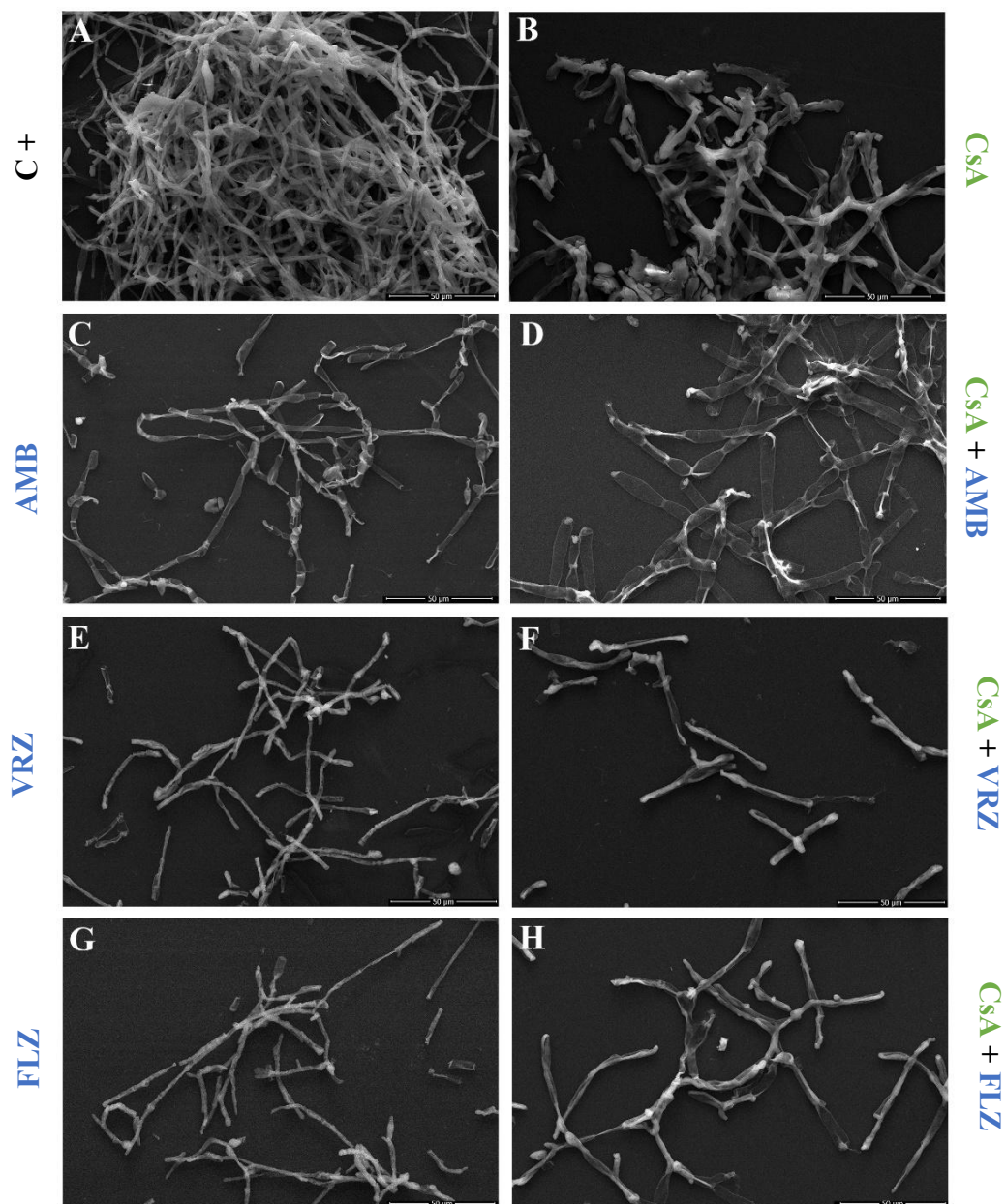


**Legenda:** Os biofilmes de *T. inkin* (n=6) foram formados em RPMI-CsA e então desafiados com AMB, VRZ ou FLZ. As linhas de padrão horizontais indicam biofilmes cultivados em 50 µg/mL de RPMI-CsA e posteriormente desafiados com antifúngicos; as linhas de padrão verticais indicam biofilmes cultivados em 100 µg/mL de RPMI-CsA e desafiados com antifúngicos. As barras de cor sólida indicam biofilmes maduros tratados com CsA ou antifúngicos. Os controles foram formados por biofilmes cultivados em RPMI sem CsA. As barras com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (\*) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre cada grupo antifúngico RPMI-CsA(50 µg/mL) e biofilme maduro tratado com 50 µg/mL de CsA sozinho (barra cinza claro). (\*\*) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre cada grupo antifúngico RPMI-CsA(100 µg/mL) e biofilme maduro tratado com 100 µg/mL de CsA sozinho (barra cinza escuro).

### 6.2.6 CsA colapsou a ultraestrutura dos biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii*

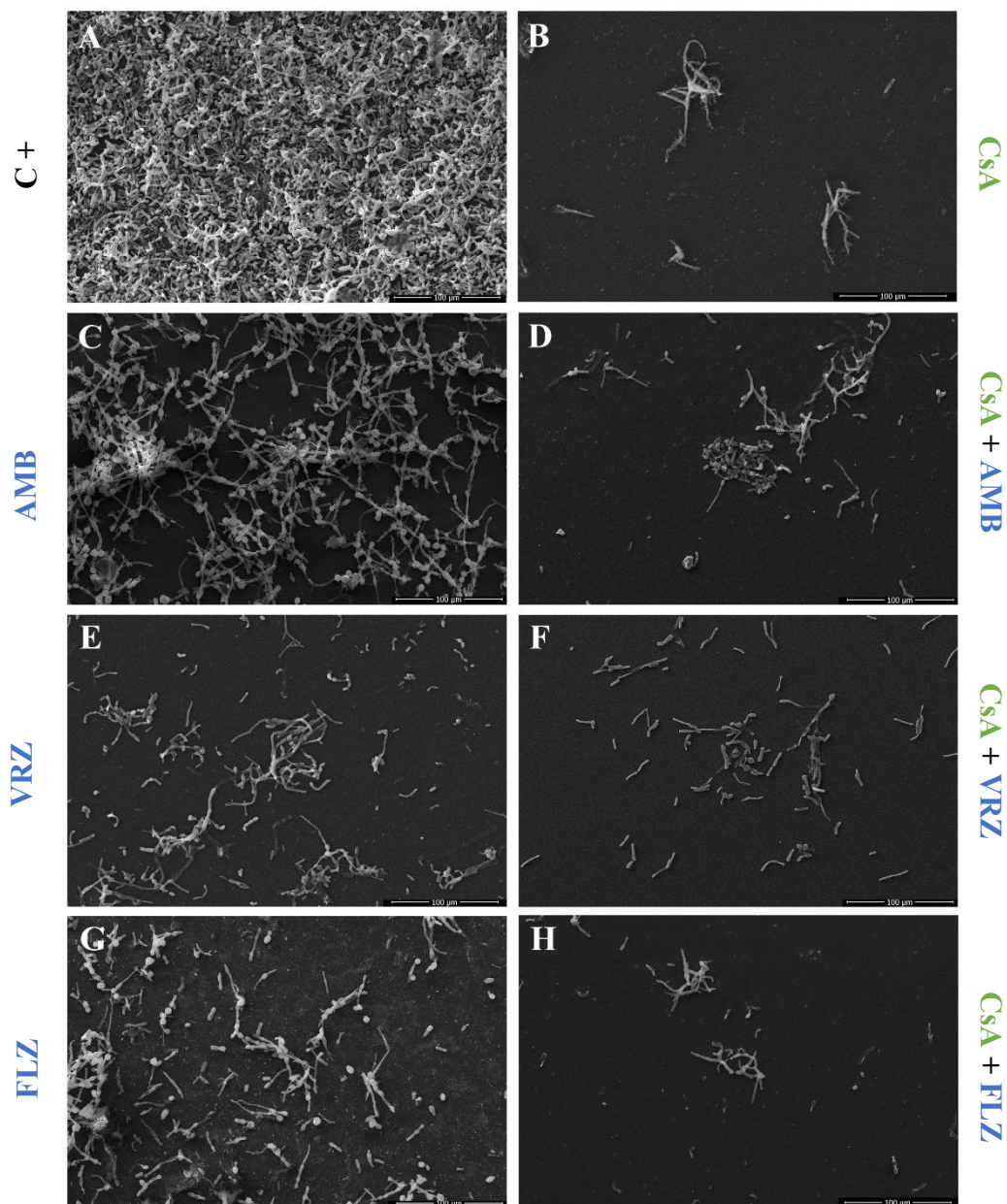
Biofilmes de *T. inkin* CEMM 05-6-074 (Figura 15A) e *T. asahii* CEMM 05-6-072 (Figura 16A) formados em meio RPMI mostraram uma estrutura formada por uma malha multicamadas de hifas e conídios. CsA (100 µg/mL) rompeu a estrutura dos biofilmes de *Trichosporon spp.* (Figura 15B e Figura 16B) e AMB (Figura 15C e Figura 16C), VRZ (Figura 15E e Figura 16E) e FLZ (Figura 15G e Figura 16G) danificaram os biofilmes de *Trichosporon spp.* Biofilmes maduros formados em RPMI-CsA e então desafiados com antifúngicos (Figuras. 15D, 15F, 15H, 16D, 16F e 16H) apresentaram menos células e hifas e conídios colapsados e quebrados, quando comparados aos biofilmes formados em RPMI tratados apenas com antifúngicos (Figuras. 15C, 15E, 15G, 16C, 16E e 16G).

**Figura 15.** Efeito da **CsA** e antifúngicos em biofilmes de *T. inkin* por imagens de MEV



**Legenda:** (A) Controle de crescimento de biofilme formado em RPMI sem antimicrobianos. Biofilmes maduros formados em RPMI e então tratados com 100 µg/mL de **CsA** (B), 10 µg/mL de **AMB** (C), 50 µg/mL de **VRZ** (E) e 64 µg/mL de **FLZ** (G). Biofilmes maduros formados em 100 µg/mL de RPMI-**CsA** e então desafiados com 10 µg/mL de **AMB** (D), 50 µg/mL de **VRZ** (F) e 64 µg/mL de **FLZ** (H). Ampliação: 2.000X.

**Figura 16.** Efeito da **CsA** e antifúngicos em biofilmes de *T. asahii* por imagens de MEV



**Legenda:** (A) Controle de biofilme formado em RPMI sem antimicrobianos. Biofilmes maduros formados em RPMI e então tratados com 100 µg/mL de **CsA** (B), 10 µg/mL de **AMB** (C), 50 µg/mL de **VRZ** (E) e 64 µg/mL de **FLZ** (G). Biofilmes maduros formados em 100 µg/mL de RPMI-**CsA** e então desafiados com 10 µg/mL de **AMB** (D), 50 µg/mL de **VRZ** (F) e 64 µg/mL de **FLZ** (H). Ampliação: 1.000X.

## 6.2.7 *Análises in silico*

### 6.2.7.1 *Consulta de banco de dados*

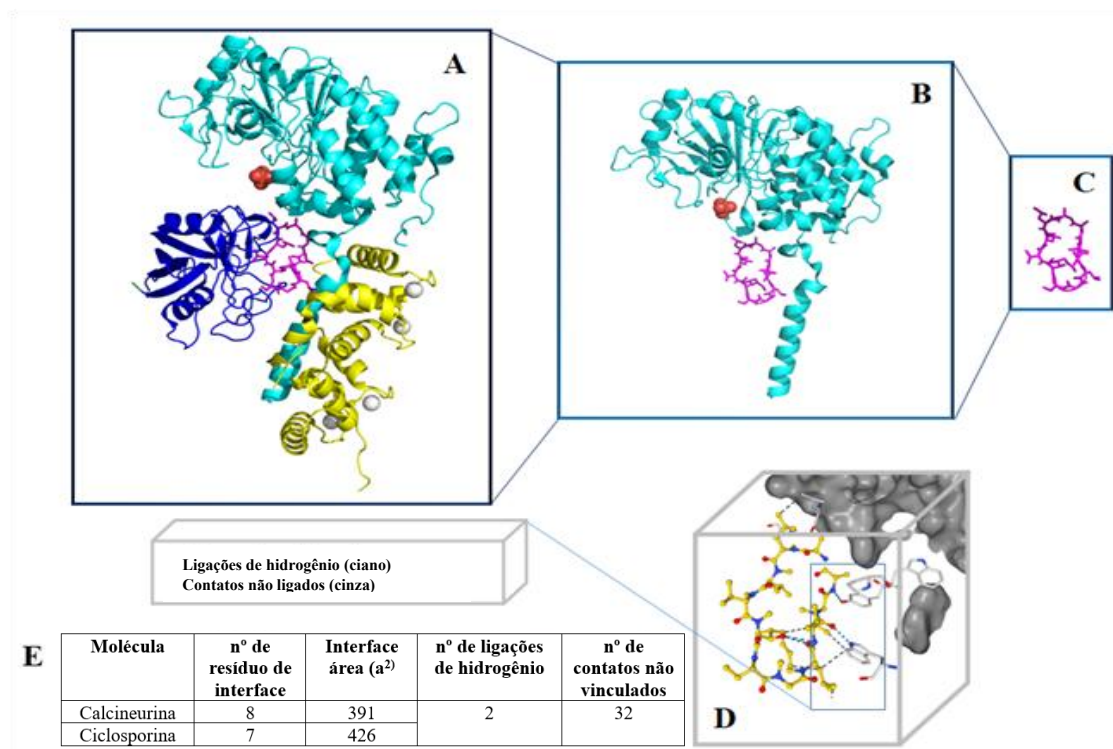
Apenas duas sequências de proteínas foram encontradas no banco de dados do NCBI com mais de 60% de identidade com as sequências da subunidade A da calcineurina em *C. albicans* e humanos. Usando ambas as sequências de entrada da subunidade A da calcineurina em *C. albicans* ou humanos, as mesmas saídas foram encontradas. Os resultados mostraram sequências homólogas com 99% de identidade da subunidade A da calcineurina em duas cepas de *T. asahii* (cepa clínica, XP\_0141763351; cepa ambiental, EKC99843.1). A sequência homóloga da subunidade A da calcineurina da cepa clínica de *T. asahii* foi selecionada para os testes subsequentes de modelagem molecular e *docking* molecular. A sequência escolhida é o resultado da análise do genoma de *T. asahii* CBS 2479, uma cepa padrão isolada de uma lesão psoriática progressiva (YANG, et al., 2023; YANG, et al., 2012).

### 6.2.7.2 *Modelagem molecular e simulações de encaixe*

A modelagem molecular da subunidade A da calcineurina em *T. asahii* foi realizada usando os modelos 6TZ6 de *C. albicans* e 1MF8 (**Figura 17**) de humanos. Os modelos validados pelo servidor MolProbity para verificar a localização dos resíduos de aminoácidos no gráfico de Ramachandran foram refinados para melhorar a estereoquímica e corrigir algum impedimento estérico resultante.

Ensaio de *docking* molecular foram usados para validar o servidor DockThor. As imagens foram geradas pelo programa PyMOL.

**Figura 17.** Estrutura cristalina da calcineurina humana complexada com Ciclosporina A (CsA) e ciclofilina.



**Legenda:** (A). Estrutura cristalina da subunidade A humana da calcineurina complexada com CsA (B). Cristal de CsA em sua conformação nativa (C). As principais interações moleculares entre calcineurina humana e CsA obtidas pelo DockThor são semelhantes às interações cristalinas (D). Análise estatística da região de interface do complexo gerado pelo servidor PDBsum (E).

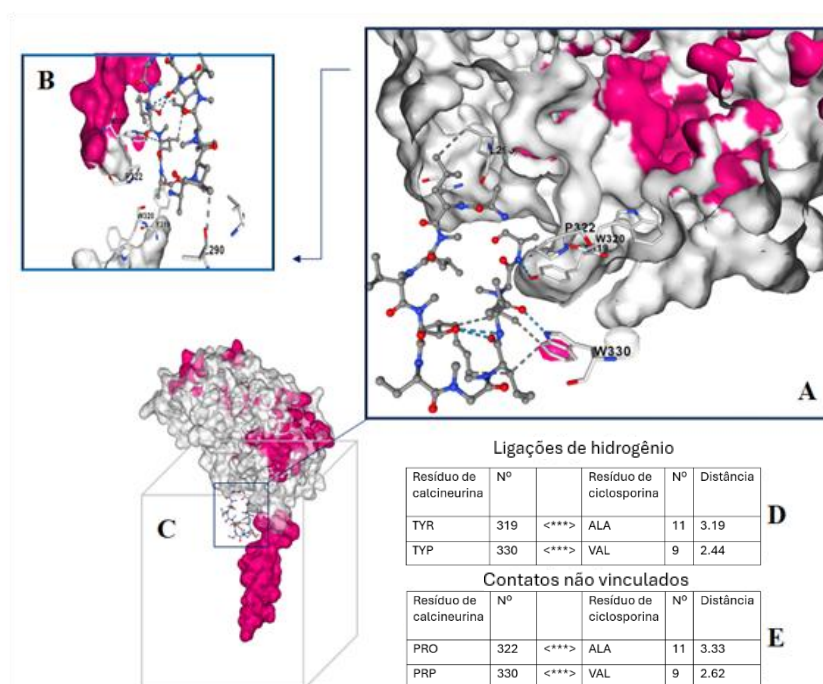
Os servidores DockThor e FRODOCK mostraram que CsA interagiu no centro ativo da subunidade A da calcineurina em *T. asahii*, demonstrando a confiabilidade das interações. As simulações de encaixe molecular sugerem que CsA pode bloquear o sítio ativo da subunidade A da calcineurina em *T. asahii*, alterando o metabolismo do fungo (**Figura 18**).

Os resultados do re-docking molecular após a separação dos complexos cristalizados em *Candida spp.* e humanos e a realização dos testes DockThor mostraram que as energias de interação da subunidade A da calcineurina de *T. asahii* com CsA foram muito próximas das energias dos complexos cristalizados. A **Tabela 15** mostra as energias de interação entre os complexos estudados neste trabalho e a predição validada pelo servidor DockThor.

Quanto à análise estrutural da interface do complexo, a subunidade A da calcineurina, responsável pelo centro ativo do heterodímero em *T. asahii*, apresentou o

mesmo número de interações de ponte de hidrogênio que o cristal do complexo calcineurina-CsA humano. No entanto, os resultados mostraram outras interações além das ligações de hidrogênio, como interações hidrofóbicas e fracas (**Figura 18**).

**Figura 18.** Simulação de encaixe proteína-peptídeo de CsA e calcineurina em *T. asahii*. Um complexo resultante de ensaios de encaixe molecular DockThor entre a subunidade A de calcineurina prevista em *T. asahii* e CsA em sua conformação nativa



**Legenda:** (A). Outras interações intermoleculares são observadas de uma perspectiva alternativa (B). A subunidade A de calcineurina e CsA são observadas em seu total (C). Interações de ligações de hidrogênio intermoleculares geradas pelo programa PyMOL e pelo servidor de análise estrutural PDBsum (D). Interações que não formam ligações de hidrogênio (E) incluem interações hidrofóbicas e outras interações fracas.

**Tabela 15.** Descrição das principais energias de interação obtidas após simulações de acoplamento molecular usando o servidor DockThor.

<b>Ligantes e receptores utilizados</b>	<b>Pontuação<sup>a</sup></b>	<b>Energia T<sup>b</sup></b>	<b>Energia I<sup>c</sup></b>	<b>Energia VdW<sup>d</sup></b>	<b>Energia eletrostática<sup>e</sup></b>
Calcineurina humana cristalizada e CsA	-9.457	287.465	-32.897	-24.188	-8.709
Calcineurina e CsA cristalizados de <i>C. albicans</i>	-9.757	287.856	-31.784	-29.075	-2.709
Calcineurina e CsA previstas para <i>T. asahii</i>	-8.395	290.160	-29.259	-23.335	-5.924

**Legenda:**

<sup>a</sup>A energia de ligação geral combina vários fatores de energia. Pontuações mais baixas indicam interações mais favoráveis.

<sup>b</sup>Energia total do sistema, incluindo interações intermoleculares e intramoleculares.

<sup>c</sup>Energia intermolecular entre o ligante e o receptor reflete a força das ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de van der Waals.

<sup>d</sup>Forças atrativas e repulsivas são essenciais na afinidade de ligação geral entre moléculas.

<sup>e</sup>Reflete as forças de interação entre átomos ou grupos carregados no ligante e no receptor

### 6.3 3ª PARTE EXPERIMENTAL – INIBIÇÃO DE Hsp90

#### 6.3.1 Teste de sensibilidade de RAD em células planctônicas

RAD foi capaz de inibir completamente o crescimento de *T. asahii* e *T. inkin*, em concentrações que variaram de 1.56 µg/mL a 6.25 µg/mL e de 1.25 µg/mL a 3.12 µg/mL, respectivamente (Tabela 16).

**Tabela 16.** Concentrações inibitória mínimas referente aos testes de sensibilidade planctônica em *T. asahii* e *T. inkin*.

Espécies	Cepas	CIM RAD (µg/mL)
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	6.25
	CEMM 05-6-073	1.56
	CEMM 03-1-072	3.12
	CEMM 80	6.25
	CEMM 81	6.25
	CEMM 82	6.25
<i>T. inkin</i>	CEMM 05-6-074	1,56
	CEMM 01-1-145	0,78
	CEMM 05-6-075	1.56
	CEMM 01-1-144	3.12
	CEMM 01-1-143	1.56
	CEMM 03-1-073	0,78
	CEMM 05-6-057	3,12

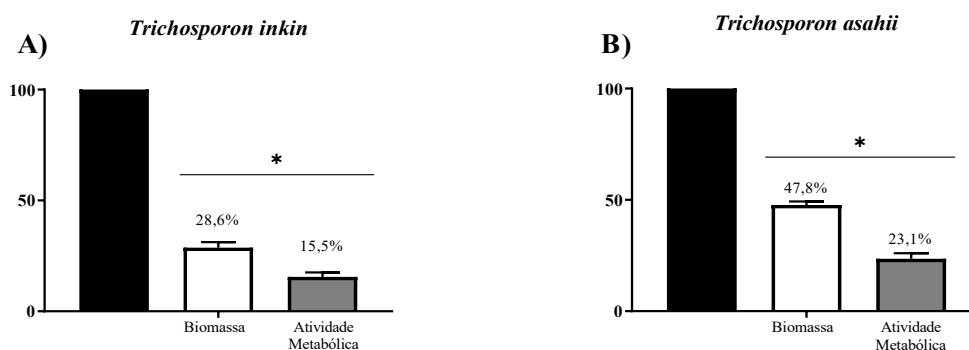
**Legenda:**

CIM = Concentração inibitória mínima

### 6.3.2 Inibição de Hsp90 reduz a atividade metabólica e biomassa dos biofilmes maduros de *T. asahii* e *T. inkin*.

A inibição de Hsp90 ocasionada pelo RAD reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes maduros de *T. asahii* e *T. inkin* (Figura 19). RAD reduziu em 76,9% e 84,5% a atividade metabólica das cepas de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente. RAD também foi capaz de reduzir a biomassa dos biofilmes de *T. asahii* em 52,2% e 71,4% em *T. inkin*.

Figura 19. Efeito da inibição de Hsp90 na atividade metabólica e biomassa dos biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii*.



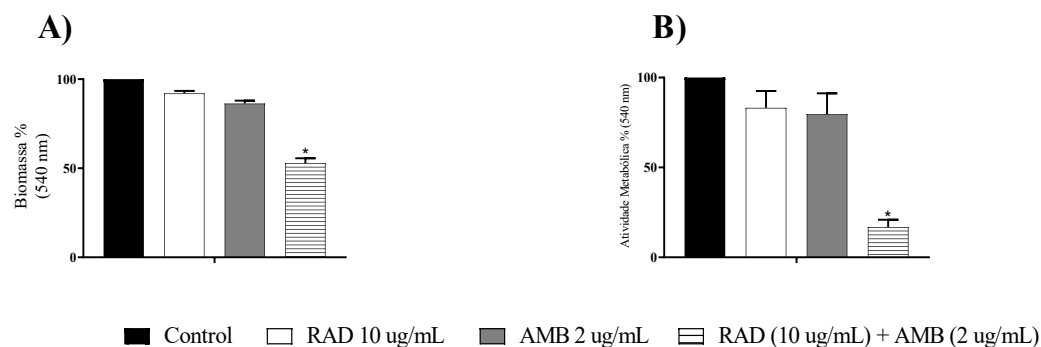
**Legenda:** Atividade metabólica (A, B) e biomassa (C, D) dos biofilmes de *T. inkin* ( $n = 6$ ) e *T. asahii* ( $n = 7$ ). Biofilmes formados em RPMI (controle, barras escuras) ou RPMI suplementado com RAD a 62,5  $\mu\text{g/mL}$  para *T. asahii* e 100  $\mu\text{g/mL}$  em *T. inkin*. Barras brancas referente a biomassa e barras cinzas referente atividade metabólica. \*Diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao respectivo controle sem droga ( $p < 0,05$ ).

### 6.3.3 Inibição de Hsp90 aumenta a susceptibilidade de AMB frente aos biofilmes maduros de *T. asahii* e *T. inkin*.

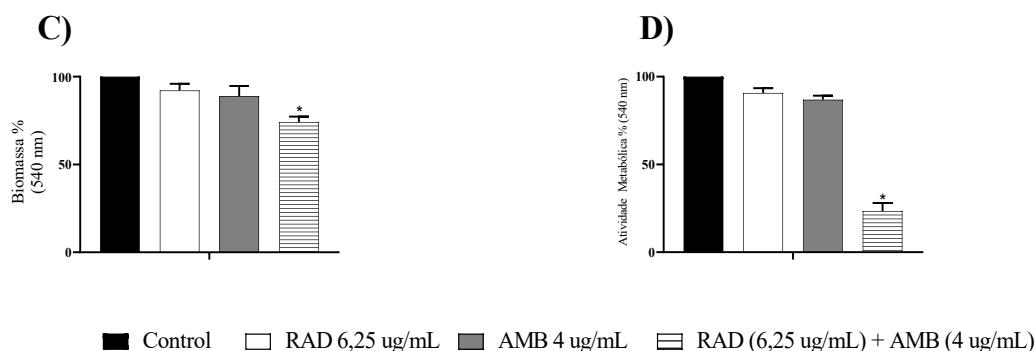
A combinação formada por concentrações sub-inibitórias de RAD + AMB reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes maduros (Figura 20). RAD + AMB reduziu em 76,6% e 83,2% a atividade metabólica das cepas de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente. Nas mesmas concentrações, a combinação RAD + AMB foi capaz de reduzir a biomassa dos biofilmes de *T. asahii* em 25,9% e 47,2% em *T. inkin*.

**Figura 20.** Efeito da inibição de Hsp90 na sensibilidade de biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii* a RAD e AMB.

### *Trichosporon inkin*



### *Trichosporon asahii*

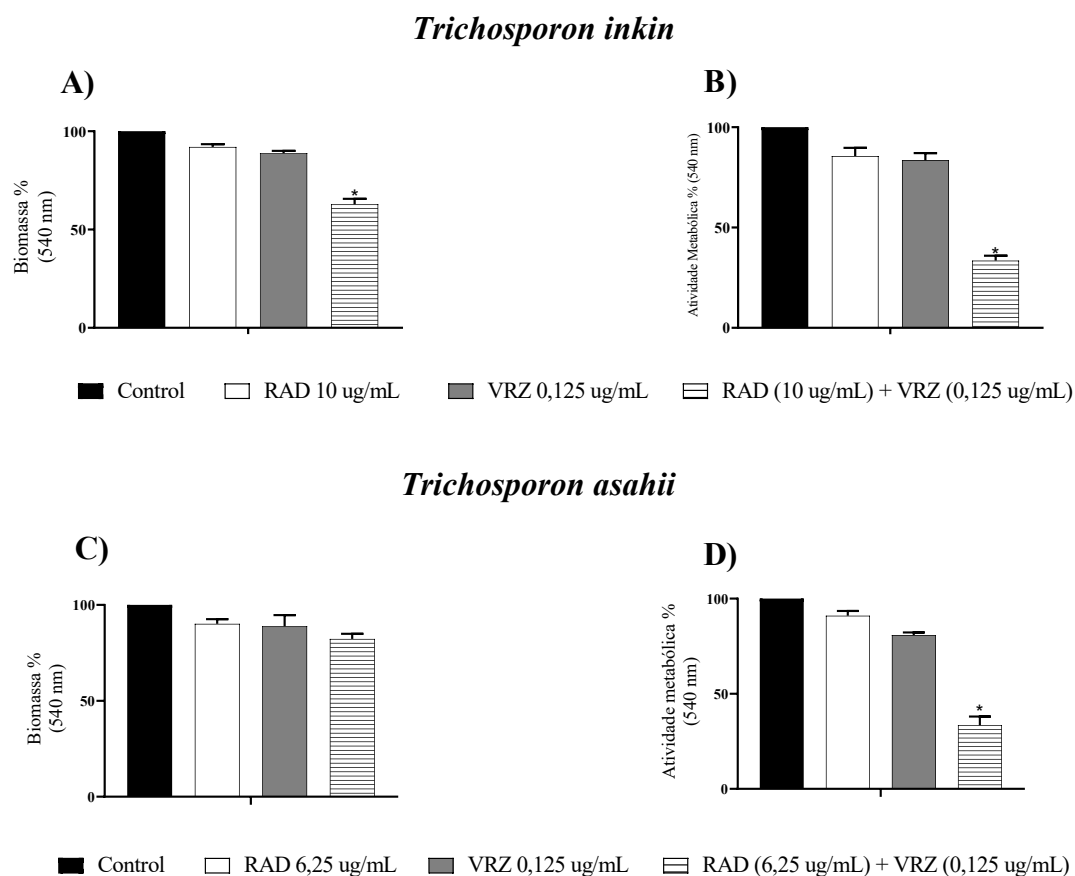


**Legenda:** Os biofilmes de *T. inkin* (n=6) e *T. asahii* (n=7) foram formados em RPMI e então desafiados com RAD e AMB. Os controles foram formados por biofilmes cultivados em RPMI sem drogas (barras escuras). As barras brancas representam a adição de RAD 6,25 µg/mL (*T. asahii*) e 10 µg/mL (*T. inkin*). As barras cinzas significam a adição de AMB 4 µg/mL (*T. asahii*) e 2 µg/mL (*T. inkin*). As barras brancas com listras horizontais representam a adição de RAD + AMB concomitantemente, nas condições já descritas anteriormente. \*Diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao respectivo controle sem droga ( $p < 0,05$ ).

#### 6.3.4 *Inibição de Hsp90 aumenta a sensibilidade de VRZ frente aos biofilmes maduros de T. asahii e T. inkin*

A combinação formada por concentrações sub-inibitórias de RAD + VRZ reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes maduros (Figura 21). RAD + VRZ reduziu em 66% e 66,5% a atividade metabólica das cepas de *T. asahii* e *T. inkin*, respectivamente. Nas mesmas concentrações, a combinação RAD + VRZ foi capaz de reduzir a biomassa dos biofilmes de *T. asahii* em 17,8% e 37,2% em *T. inkin*.

**Figura 21.** Efeito da inibição de Hsp90 na sensibilidade de biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii* a **RAD** e **VRZ**.



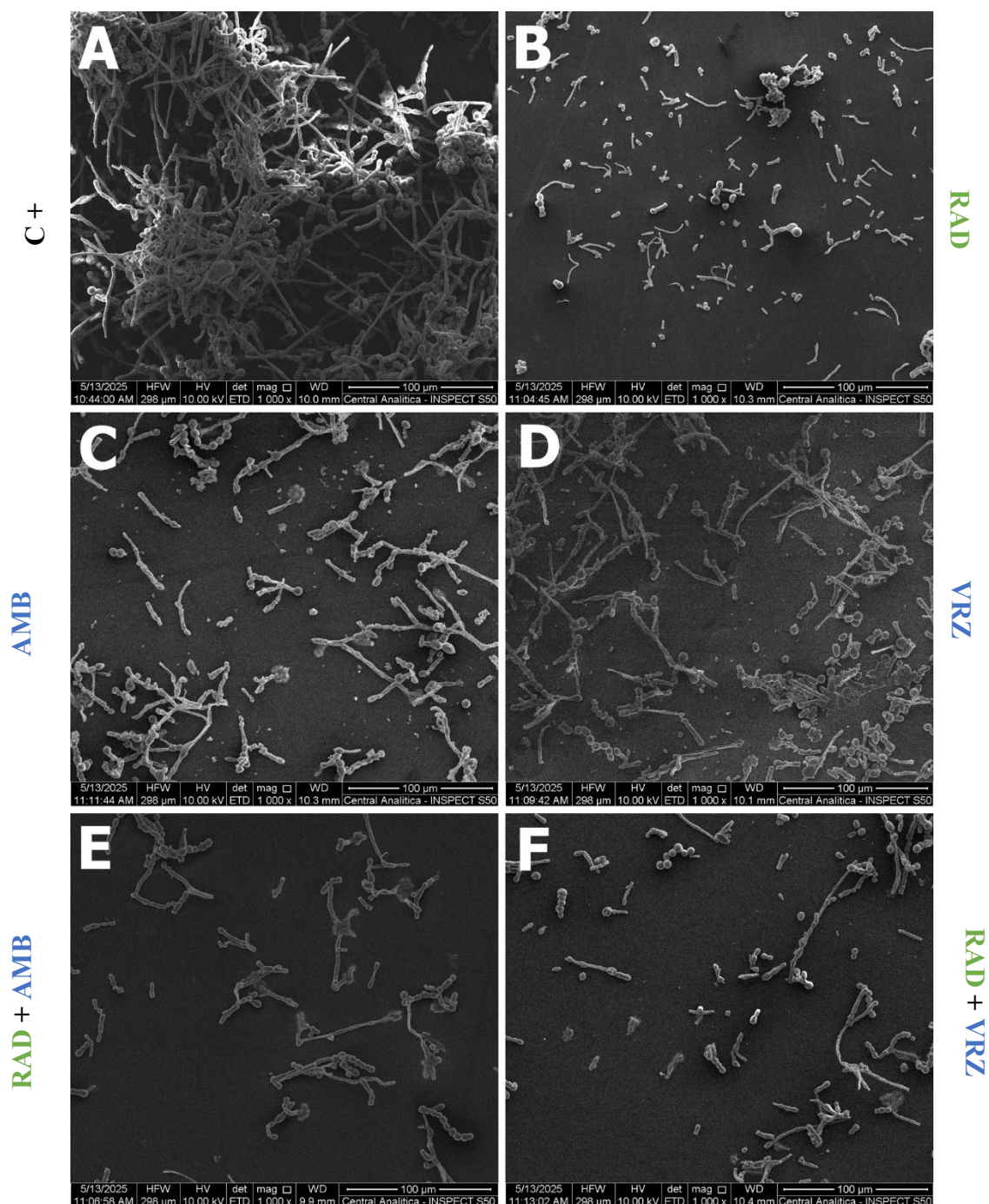
**Legenda:** Os biofilmes de *T. inkin* (n=6) e *T. asahii* (n=7) foram formados em RPMI e então desafiados com **RAD** e **VRZ**. Os controles foram formados por biofilmes cultivados em RPMI sem drogas (barras escuras). As barras brancas representam a adição de **RAD** 6,25  $\mu\text{g/mL}$  (*T. asahii*) e 10  $\mu\text{g/mL}$  (*T. inkin*). As barras cinzas significam a adição de **VRZ** 0,125  $\mu\text{g/mL}$  para *T. asahii* *T. inkin*. As barras brancas com listras horizontais representam a adição de **RAD** + **VRZ** concomitantemente, nas condições já descritas anteriormente. \*Diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao respectivo controle sem droga ( $p < 0,05$ ).

### 6.3.5 **RAD** alterou a ultraestrutura dos biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii*

Biofilmes maduros de *T. inkin* CEMM 05-6-074 (**Figura 22A**) e *T. asahii* CEMM 05-6-072 (**Figura 23A**) mostraram uma estrutura formada robusta com camadas de hifas e conídios. **RAD** (10  $\mu\text{g/mL}$  e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) foi capaz de romper a estrutura dos biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii* (**Figura 22B** e **Figura 23B**) e **AMB** nas concentrações de 2  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 22C** e **Figura 23C**) e **VRZ** na concentração de 0,125  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 23D** e **Figura 24D**) danificaram os biofilmes de *Trichosporon* spp. Os biofilmes que depois de maduros foram expostos a **RAD** e então desafiados com

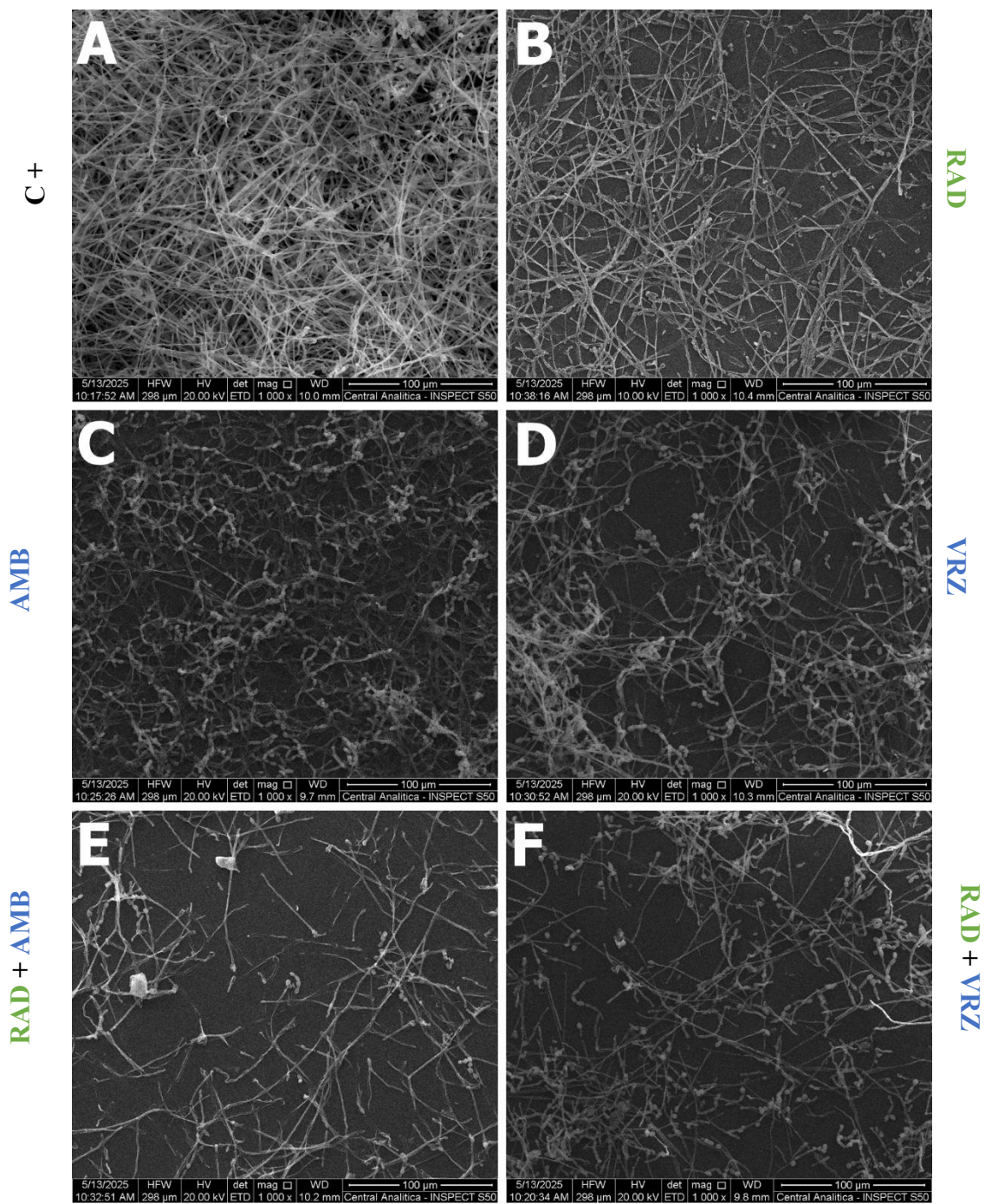
antifúngicos (**Figuras 22E, 22F, 23E e 23F**) apresentaram menos células e hifas e conídios colapsados e quebrados, quando comparados aos biofilmes maduros tratados apenas com antifúngicos (**Figura 22C, 23C, 23D e Figura 24D**).

**Figura 22.** Efeito do **RAD** e antifúngicos em biofilmes de *T. inkin* por imagens de MEV



**Legenda:** (A) Controle de crescimento de biofilme maduros formados em RPMI sem antimicrobianos. Biofilmes maduros tratados com 10 µg/mL de **RAD** (B), 2 µg/mL de **AMB** (C), 0,125 µg/mL de **VRZ** (D). Biofilmes maduros, exposto a 10 µg/mL de **RAD** e então desafiados com 2 µg/mL de **AMB** (E) e 0,125 µg/mL de **VRZ** (F). Ampliação: 1.000X.

**Figura 23.** Efeito do RAD e antifúngicos em biofilmes de *T. asahii* por imagens de MEV



**Legenda:** (A) Controle de crescimento de biofilme maduros formados em RPMI sem antimicrobianos. Biofilmes maduros tratados com 6,25  $\mu\text{g/mL}$  de RAD (B), 4  $\mu\text{g/mL}$  de AMB (C), 0,125  $\mu\text{g/mL}$  de VRZ (D). Biofilmes maduros, exposto a 6,25  $\mu\text{g/mL}$  de RAD e então desafiados com 4  $\mu\text{g/mL}$  de AMB (E) e 0,125  $\mu\text{g/mL}$  de VRZ (F). Ampliação: 1.000X.

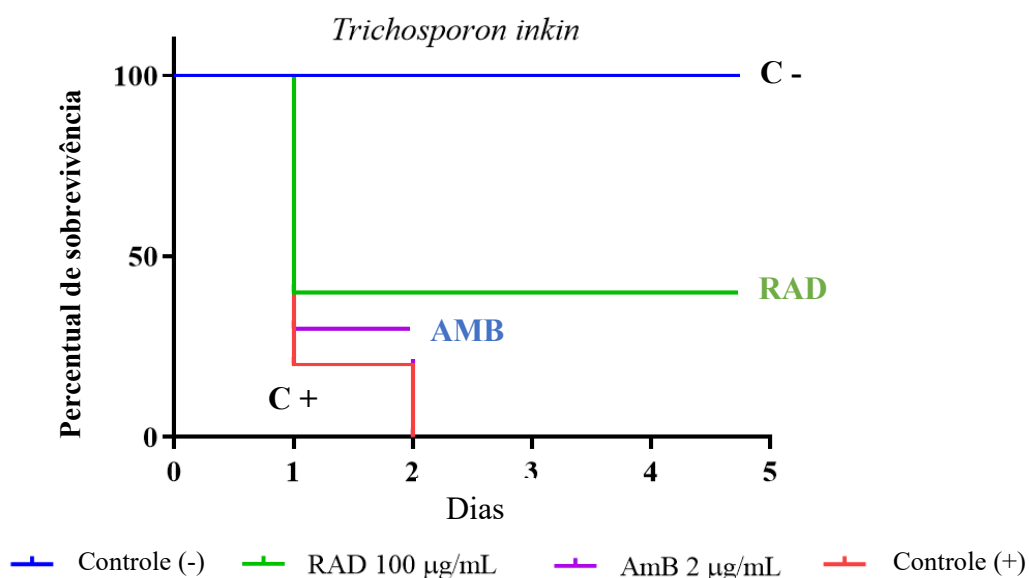
### 6.3.6 Inibição de Hsp90 aumenta a sobrevivência de *G. mellonella*

Os dados da análise de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas com *T. inkin* foram representados pela curva de sobrevivência de Kaplan-Meier.

Larvas inoculadas apenas com PBS (controle negativo) mantiveram-se viáveis até o final do experimento. Após 24 h de infecção com *T. inkin*, 80% das larvas sem tratamento (controle positivo) morreram, ao passo que foram observados 60% de morte no grupo tratado com RAD e 70% no grupo tratado com AMB. Todavia, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados com RAD e com AMB ( $p=0.3266$ ).

Após 48h de infecção, os grupos sem tratamento (controle positivo) e tratados com AMB alcançaram 100% de mortalidade. Apenas o grupo tratado com RAD permaneceu viável após 120h de infecção, com 40% de sobrevivência das larvas. Diferenças significativas foram observadas apenas entre os grupos sem tratamento (Controle positivo) e tratado com RAD ( $p=0.0043$ ) (Figura 24).

Figura 24. Percentual de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas por *T. inkin*



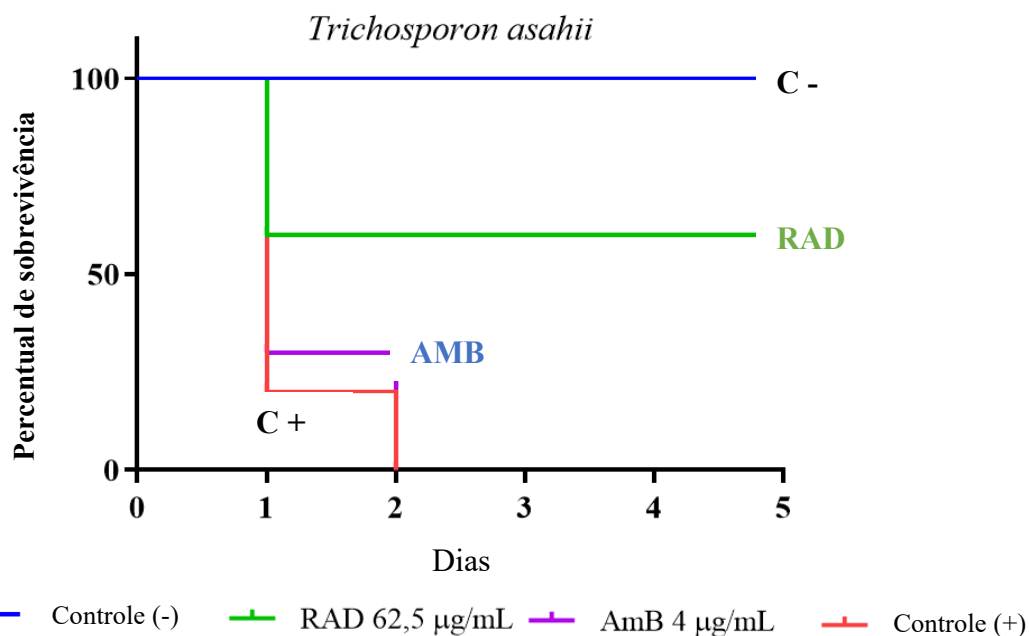
**Legenda:** Barras azuis correspondem ao controle negativo – vermes que receberam 10 µg/mL de PBS estéril. Barras verdes, larvas que receberam 100 µg/mL de RAD após infecção de *T. inkin*. Barras roxas, vermes que receberam 2 µg/mL de AMB após por *T. inkin*, Barra vermelha representam o controle positivo – vermes que foram infectados e não receberam tratamento.

Os dados da análise de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas com *T. asahii* foram representados pela curva de sobrevivência de Kaplan-Meier.

Larvas inoculadas apenas com PBS (Controle negativo) mantiveram-se viáveis até o final do experimento. Após 24 h de infecção com *T. asahii*, 80% das larvas sem tratamento (Controle positivo) morreram, ao passo que foram observados 40% de morte no grupo tratado com RAD e 70% no grupo tratado com AMB, sendo as diferenças entre esses dois grupos significativa ( $p=0.0091$ ).

Após 48h de infecção, os grupos sem tratamento (Controle positivo) e tratados com AMB alcançaram 100% de mortalidade. Apenas o grupo tratado com RAD permaneceu viável após 120h de infecção, com 60% de sobrevivência das larvas. Diferenças significativas também foram observadas entre os grupos sem tratamento (Controle positivo) e tratado com RAD ( $p=0.0054$ ). O tratamento com AMB não teve sucesso na sobrevivência das larvas *G. mellonella* infectadas com *T. asahii* (grupos sem tratamento (Controle positivo) versus AMB,  $p=0.6147$ ) (Figura 25).

Figura 25. Percentual de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas por *T. asahii*



**Legenda:** Barras azuis correspondem ao controle negativo – vermes que receberam 10 µg/mL de PBS estéril. Barras verdes, larvas que receberam 62,5 µg/mL de RAD após infecção de *T. asahii*. Barras roxas, vermes que receberam 4 µg/mL de AMB após por *T. asahii*, Barra vermelha representam o controle positivo – vermes que foram infectados e não receberam tratamento.

## 7 DISCUSSÃO

Infecções fúngicas invasivas (IFIs) são ocasionadas em sua grande maioria por fungos oportunista, caracterizando causas importantes de morbidade e mortalidade entre pacientes pediátricos imunocomprometidos e gravemente enfermos. Pacientes pediátricos são diferentes dos adultos (especialmente aqueles gravemente enfermos), e informações sobre essa população não estão tão prontamente disponíveis (Hon et al., 2024).

*Trichosporon* spp. são fungos oportunistas que podem causar fungemia em pacientes imunologicamente comprometidos, como aqueles com distúrbios hematológicos malignos (Padovan et al., 2019; Cho, Matsukura e Sugita, 2015; Sprute et al., 2022). A tricosporonose invasiva é raramente documentada em crianças e é relatada principalmente em neonatos prematuros e em crianças imunocomprometidas com neoplasias hematológicas, o que expõe a escassez de dados, principalmente a nível nacional.

Embora as infecções fúngicas em geral tenham recebido atenção crescente, ainda há pouco conhecimento sobre aquelas causadas por *Trichosporon* spp. Grande parte das informações disponíveis sobre tricosporonose em pacientes pediátricos provém principalmente de relatos isolados de casos.

A faixa etária das crianças entre 2 anos até < 12 anos foi a mais prevalente com 12 casos (sete altas hospitalar e 6 óbitos), corroborando com o estudo de Kara e colaboradores (2022) que possuiu prevalência de crianças acometidas por *Trichosporon* spp., <2 a > 12 anos de idade. Em relação ao sexo o estudo computou a presença de 17 meninos e 16 meninas, com cinco óbitos entre os meninos e sete entre as meninas.

Depois da candidíase, a tricosporonose é considerada a segunda infecção fúngica mais frequente que leva à fungemia em pacientes com neoplasias hematológicas (Almeida, Junior; Hennequin, 2016; Cesaro et al., 2017; Chitasombat et al., 2012). Dos 28 pacientes contemplados neste estudo (**tabela 4**) nove eram portadores de alguma doença hematológica (câncer) como doença de base, além de outros fatores internos e externo, o que, muito provavelmente serviu de agravante para a disseminação fúngica. Dos nove paciente deste estudo, três receberam alta e seis foram a óbito, sugerindo que

pacientes nestas condições tendem a estar com o sistema imunológico comprometido, principalmente nesta faixa etária infantil.

Desde o primeiro caso de tricosporonose invasiva relatado por Watson e Kallichurum em 1970, espécies de *Trichosporon* têm recebido crescente reconhecimento como patógenos fúngicos oportunistas emergentes. Em nosso estudo a identificação presuntiva dos isolados identificados dentro do período temporal da pesquisa apontou que 100% dos casos foram ocasionados pela espécie de *T. asahii*, (**tabela 13**) corroborando com diversos achados na literatura que enfatizam os grandes níveis de acometimento desta espécie, principalmente em infecções profundas de pacientes imunocomprometidos. Um exemplo claro, está documentado em uma pesquisa multicêntrica realizado por Guo e colaboradores (2019) que apontou *T. asahii*, como a principal e mais frequente causa de doença invasiva, como também os estudos de Chagas-neto et al., (2009) e Ruan e Lin (2009) que apresentam a mesma prevalência.

Ainda no estudo de Roilides (2022) foi documentado que 24 casos de tricosporonose invasiva foram identificados em neonatos com a presença de cateter venoso central e uso de antibióticos de amplo espectro reconhecidos como os principais fatores predisponentes, 32 casos foram identificados em crianças com malignidades ou distúrbios hematológicos, predominantemente com neutropenia grave. Sabe-se que o uso de antibióticos de amplo espectro e bacteremia concomitante desempenham um papel significativo no desequilíbrio da microbiota, resultando em uma potencial IFI, ainda, a presença de um cateter venoso central (CVC) e a ruptura da barreira mucosa podem fornecer uma porta de entrada para *Trichosporon* spp, além disso, a formação de biofilmes de *Trichosporon* spp. nas superfícies do cateter é importante na patogênese da tricosporonose invasiva, sendo viável na maioria dos casos a remoção do cateter.

Neste estudo, as crianças acometidas também faziam uso de dispositivos invasivos como - Sonda para alimentação, cateter venoso central, cateter intravenoso periférico, sonda vesical de demora, tubo endotraqueal e orotraqueal, cânula de Traqueostomia, dentre outros (**tabela 5**) – e uso profilático de antibióticos como vancomicina, meropenem, amicacina, teicoplanina, cefepime, micafungina, ceftriaxona, tazocim, ciprofloxacina, dentre outros (**tabela 8**) – ambos os casos apresentam números significativos de óbitos.

Mais recentemente, Roilides (2022) em uma revisão bibliográfica global sobre o acometimento de *Trichosporon* spp. apenas no público pediátrico, constatou que *T. asahii* foi isolado do sangue na maioria dos casos em 24/32 dos casos. Em contrapartida, neste estudo, houve prevalência de isolamento a partir de amostras de urina em 15 casos (nove altas e cinco óbitos), seguido de sangue de hemocultura com seis casos (3 altas e 3 óbitos) (tabela 6).

O início imediato da terapia antifúngica adequada é considerado primordial para a obtenção de um resultado favorável no tratamento. Este trabalho revelou 11 casos pediátricos com infecções emergentes em pacientes que receberam tratamento com FLZ – uma das drogas de escolha para o tratamento dessas infecções, deste, oito receberam alta hospitalar e apenas três evoluíram para óbito, confirmando assim o descrito na literatura sobre o potencial efeito dos azólicos frente a *Trichosporon* spp (Shapiro; Robbins; Cowen, 2011; Chang et al., 2017). Alguns artigos apresentam o efeito promissor de VZR frente a essas infecções, como o estudo de Kara et al., (2022), indo em desencontro aos achados deste estudo, onde as duas crianças que realizam tratamento com VRZ foram a óbito (tabela 11)

A literatura descreve que anfotericina B demonstrou alguma eficácia positiva contra *Trichosporon* spp. *in vitro*, mas funciona mal com infecções disruptivas, particularmente em pacientes com neutropenia profunda em altas doses de AMB (Walsh et al., 2004). Estes autores mostraram que 77% dos isolados de *Trichosporon* spp. não foram mortos em níveis séricos de AMB atingíveis. Resultados negativos à AMB também são documentos na literatura em pacientes adultos (Girmenia et al., 2005; Colombo; Padovan; Chaves, 2011)

A sensibilidade variável à AMB *in vitro* e *in vivo* pode ser explicada pela produção de uma camada de biofilme. A capacidade de *T. asahii* de produzir biofilmes é bem documentada *in vitro* (Di Bonaventura et al., 2006; Cordeiro et al., 2015). Além disso, foi relatado que uma maior resistência antifúngica à AMB é diretamente proporcional ao aumento da produção de biofilme (Montoya et al., 2018). Portanto, a resposta esperada à AMB pode não ser observada no ambiente clínico, apesar da sensibilidade *in vitro* à AMB.

Os resultados negativos de AMB na clínica relativos acima corroboram com os achados neste estudo. Sete pacientes fizeram o uso clínico para o tratamento da

trichosporonose invasiva, deste, apenas um progrediu para alta hospitalar e seis evoluíram em óbito – sendo estatisticamente significativa (**tabela 11**).

A capacidade do *Trichosporon* spp. de formar biofilmes é conhecida por ser um fator determinante na persistência da infecção, especialmente em pacientes com múltiplos dispositivos invasivos. Os biofilmes de *Trichosporon* spp. são altamente tolerantes a medicamentos antifúngicos e frequentemente estão implicados em infecções graves e falhas terapêuticas (Arastehfar et al., 2021; Ma et al., 2023). A exposição contínua a **FLZ** e **VRZ** foi associada ao surgimento de resistência antifúngica em *Trichosporon* spp. (Padovan et al., 2019; Malacrida et al., 2021).

Das cepas coletadas durante o período prospectivo da pesquisa, seis cepas foram classificadas como fortes formadoras de biofilmes e outras seis como moderadas formadoras (**figura 10**) indo de encontro aos achados de Cordeiro et al., (2015) e Almeida Júnior et al., (2021) que comprovaram a capacidade das cepas de *Trichosporon* spp. formarem biofilmes. Em sua forma planctônica (**tabela 14**), o teste de microdiluição em caldo mostrou que as cepas são mais tolerantes a **AMB** e mais susceptíveis aos azólicos – **VRZ** e **FLZ**, por outro lado, os biofilmes são mais tolerantes aos azólicos, sendo necessários, para algumas delas, concentrações superiores a 128 µg/mL de azólicos como **VRZ** e **FLZ** e um pouco mais susceptíveis a **AMB**.

A alta tolerância dos biofilmes de *Trichosporon* spp. a medicamentos antifúngicos tem incentivado a pesquisa sobre diferentes alvos de medicamentos para o tratamento da trichosporonose invasiva. Nossos resultados sugerem que a calcineurina não é necessária para a formação de biofilme em *T. inkin* e *T. asahii*, corroborando estudos anteriores que mostram que a calcineurina é dispensável para a formação de biofilme em *C. albicans* (Uppuluri et al., 2008) e complexo *C. parapsilosis* (Cordeiro, 2014). No entanto, os biofilmes de *T. inkin* e *T. asahii* formados na presença de **CsA** foram mais suscetíveis aos antifúngicos testados. De fato, estudos realizados por outros autores indicam que **CsA** sensibiliza biofilmes fúngicos maduros a medicamentos antifúngicos.

Biofilmes maduros de *C. albicans* foram mais suscetíveis a **AMB** e azóis em um ensaio de tabuleiro de xadrez com **CsA** (Shinde et al., 2012). Um efeito sinérgico de **CsA** e **FLZ** foi capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* e aumentar a suscetibilidade à **FLZ** (Jia et al., 2016). Aparentemente, a inibição da calcineurina não impede o crescimento de células fúngicas em estado planctônico livre, mas as torna mais

suscetíveis a antifúngicos e vários estressores químicos e físicos (Yadav & Heitman, 2023, Cruz et al., 2002).

Estudos anteriores mostraram que o inibidor de calcineurina Tacrolimus FK506 não interferiu no crescimento de células planctônicas de *T. asahii* sensíveis e resistentes à FLZ, embora tenha mostrado um forte efeito sinérgico com AMB, azóis e caspofungina (Kubiça et al., 2016).

No presente estudo, foi descoberto que o tratamento com CsA reduziu significativamente a biomassa e a atividade metabólica de biofilmes maduros de *T. inkin* e *T. asahii*. Biofilmes formados na presença de CsA mostraram maior suscetibilidade a medicamentos antifúngicos usados no tratamento de pacientes com tricosporonose invasiva.

Os mecanismos associados à atividade anti-biofilme da calcineurina ainda não estão claros, no entanto, estudos anteriores sugeriram algumas pistas: em primeiro lugar, a inibição da calcineurina em *C. albicans* causa supressão da expressão de genes relacionados ao biofilme e resistentes a medicamentos, redução da hidrofobicidade da superfície celular, bem como interrupção da concentração de cálcio intracelular (Jia et al., 2016); em segundo lugar, a interrupção da membrana pela inibição da biossíntese de ergosterol usando azóis aumenta as concentrações intracelulares do inibidor da calcineurina (Uppuluri et al., 2008).

Em *T. asahii*, a calcineurina está relacionada à resistência a danos na membrana celular e na parede celular, mas não à resistência ao estresse osmótico, homeostase de cátions ou resistência a medicamentos antifúngicos (Matsumoto et al., 2022). Assim, a exposição a medicamentos inibidores de calcineurina pode tornar as células de *Trichosporon* spp. mais sensíveis a agentes capazes de interromper a integridade da membrana plasmática, como AMB e azóis. Estratégias e ferramentas de bioinformática, como busca em banco de dados, modelagem molecular e *docking* molecular, são essenciais para elucidar mecanismos de ação para possíveis novos medicamentos.

Estudos anteriores mostraram que simulações de *docking* molecular entre CsA e proteínas de patógenos humanos são essenciais para prever possíveis sítios de ligação em alvos críticos (Prasad, et al., 2021; Antypenko, et al., 2023). Os dados presentes mostraram que CsA interagiu no mesmo sítio de ligação na calcineurina de *C. albicans*, humanos e *T. asahii*.

Dados os efeitos do tratamento com CsA em humanos, é necessário desenvolver moléculas com maior afinidade pela calcineurina fúngica. Na verdade, análogos de FK506 mostraram maior especificidade para calcineurina fúngica do que sua contraparte humana (Hoy et al., 2022; Gobeil et al., 2021). Em um estudo de Juvvadi et al. (2022), ensaios de encaixe molecular de um novo inibidor de calcineurina revelaram potenciais locais de ligação diferencial entre calcineurina humana e calcineurina de *A. fumigatus*, revelando locais promissores para o design de medicamentos.

Concomitante ao estudo do inibidor de calcineurina, neste estudo, também foi investigado a relação entre a inibição da proteína do choque térmico Hsp90 e o crescimento e virulência de *Trichosporon* spp. De tal modo, ainda que não existam estudos sobre a atividade antifúngica do RAD contra *Trichosporon* spp., é bem conhecido que este fármaco possui atividade antifúngica contra diversos patógenos fúngicos, como *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium avenaceum* e *Mucor flavus* (Fujita et al., 1999; Nicola et al., 2008; Chen et al., 2011; Kang et al., 2014; Yuan et al., 2021; Robbins; Cowen, 2023). Esses estudos mostraram que o RAD inibe o crescimento fúngico em concentrações que variam de 0,365 a 50 µg/mL.

No presente trabalho, mostramos que o RAD inibiu o crescimento planctônico de *Trichosporon* spp. em concentrações que variaram de 0,78 a 6,25 µg/mL, em biofilmes nas concentrações de 62,5 e 100 µg/mL, como também aumentou o efeito inibitório do AMB e VRZ. Estudos com *Candida albicans* (Shapiro et al., 2012) e *A. fumigatus* (Lamoth et al., 2012) mostraram que a inibição de Hsp90 também previne o crescimento dessas espécies. Além disso, o bloqueio de Hsp90 modula a morfogênese fúngica, a virulência, o desenvolvimento de biofilme e a resistência antifúngica, particularmente a azóis e equinocandinas.

Hsp90 também regula respostas ao estresse na membrana que são críticas para a sobrevivência do fungo na presença de azóis (Shapiro & Cowen, 2012; Shapiro et al., 2012), corroborando os resultados de nossa pesquisa. Descobrimos que a ação inibitória de AMB e VRZ contra os biofilmes produzidos por *Trichosporon* spp. foi aumentada pela inibição de Hsp90. O fato de *Trichosporon* spp. ser responsivo ao bloqueio de Hsp90 é particularmente importante, pois as descrições de Trichosporonose invasiva estão intimamente ligadas a processos em pacientes imunocomprometidos devido a diversos fatores como, malignidades hematológicas, neutropenia, uso abusivo de antimicrobianos,

uso prologando de dispositivos invasivos, dentre outros (Gross; Kan, 2008; Almeida Júnior, 2016; Challapilla et al., 2019).

A Hsp90 é uma proteína reguladora fundamental na disseminação de biofilmes e na resistência fenotípica a antifúngicos em células sésseis de *C. albicans* e *A. fumigatus*. A supressão genética de Hsp90 reduz a formação *in vitro* e a maturação de biofilmes gerados por *C. albicans*, além de comprometer a dispersão celular após a maturação. Ademais, verificou-se que a inibição da função de Hsp90 enfraquece a resistência de biofilmes de *C. albicans* aos azóis e de *A. fumigatus* às equinocandinas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Robbins et al., 2011). Esses achados são corroborados por nossos resultados, uma vez que a inativação de Hsp90 potencializou o efeito inibidor do VRZ sobre biofilmes de *Trichosporon* spp.

Além disso, exploramos o efeito do bloqueio de Hsp90 em um modelo de infecção experimental com *G. mellonella*. A inibição de Hsp90 reduziu a virulência de *Trichosporon* spp. e aumentou a ação de AMB e VRZ, entre os principais resultados do nosso estudo. Sabe-se que *Trichosporon* spp. é altamente patogênico contra o nematoide *Caenorhabditis elegans*, e que os genes de cápsula e virulência são necessários durante a infecção, como em modelos de mamíferos também (Cordeiro et al., 2021).

Esses achados são corroborados pela diminuição da virulência contra *G. mellonella* através do bloqueio de Hsp90 evidenciado em nosso estudo. Portanto, o presente estudo mostrou que a inibição de Hsp90 por RAD aumenta o efeito *in vitro* dos principais medicamentos antifúngicos usados no tratamento da Trichosporonose, especialmente VRZ e AMB. Assim como em células planctônicas, a inibição de Hsp90 melhora o efeito *in vitro* de antifúngicos contra a formação de biofilme e biofilmes maduros de *Trichosporon* spp.

Além disso, a inibição de Hsp90 aumenta o efeito de AMB *in vitro* e *in vivo* em um modelo de infecção experimental usando *G. mellonella*. Portanto, conclui-se que a Hsp90, assim como a calcineurina são alvos importante para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas.

## 8 CONCLUSÕES

- *T. asahii* foi o principal agente etiológico das tricosporonoses invasivas em pacientes pediátricos no Estado do Ceará;
- A tricosporonose invasiva é mais frequente nos pacientes com problemas neurológicos, cânceres e neoplasias hematológicas, com maiores taxas de mortalidade;
- A inibição da calcineurina foi capaz dificultar a produção de biofilme de *Trichosporon* spp.;
- A inibição de Hsp90 casou a morte de células planctônicas e biofilmes de *Trichosporon* spp.;

## REFERÊNCIAS

- AFHAMI, Shirin et al. Rate, Risk Factors, and Outcomes of Invasive Fungal Infections in Patients with Hematologic Malignancies. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 75, 2024.
- AKHLAGHI, Fatemeh; TRULL, Andrew K. Distribution of cyclosporin in organ transplant recipients. **Clinical Pharmacokinetics, Rhode Island**, v. 41, n. 9, p. 615–637, 2002.
- ALBOLOSHI, Ghassan J. et al. The Prevalence and Risk Factors of Trichosporonosis at King Abdulaziz University Hospital. **International Journal of General Medicine**, p. 1297-1310, 2024.
- AL-DHAHERI, R. S.; DOUGLAS, L. J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1884-1887, 2008.
- ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Infecção invasiva por *Trichosporon*: uma revisão sistemática sobre um patógeno fúngico reemergente. **Fronteiras em microbiologia**, v. 7, p. 1629, 2016.
- ALMEIDA JÚNIOR, João N.; HENNEQUIN, Christophe. Invasive *Trichosporon* infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1629, 2016.
- ALP, S.; GULMEZ, D.; AYAZ, C.M.; ARIKAN-AKDAGLI, S; AKOVA, M. Fungaemia due to rare yeasts in a tertiary care university centre within 18 years. **Mycoses**, v. 63, n. 5, p. 488-493. 2020.
- ALP, S.; GULMEZ, D.; AYAZ, C.M.; ARIKAN-AKDAGLI, S; AKOVA, M. Fungaemia due to rare yeasts in a tertiary care university centre within 18 years. **Mycoses**, v. 63, n. 5, p. 488-493. 2020.
- ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 5, p. 400, 2014.
- ARAMBURU, J.; HEITMAN J.; and CRABTREE, G. R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. **EMBO Reports**. v. 5, p. 343-348, 2004.
- ARASTEHFAR, Amir et al. Multidrug-resistant *Trichosporon* species: underestimated fungal pathogens posing imminent threats in clinical settings. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 679-698, 2021.
- ARAUJO, I. R. M.; MARQUES, S. G.; Tricosporonoses: etiologia, manifestações clínicas, diagnósticos laboratoriais, epidemiologia e tratamento. **CONNEPI**, 2010.
- ARNON, S.I; LITMANOVITZ, I. Diagnostic tests in neonatal sepsis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 3, p. 223-227, 2008.
- ATEHORTUA, M. V. A. et al. Tricosporonosis en un paciente con leucemia aguda. **Acta Colombiana de Cuidado Intensivo**, v. 17, n. 1, p. 68-75, 2017.
- BARTH JUNIOR, V. C. **Avaliação da formação de células persistentes em *Acinetobacter baumannii***. 2014. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

- BAYM, M; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, n. 6268, 2016.
- BEHREND, G. Ueber Trichomycosis nodosa (Juhel-Rényo): Piedra (Osorio). **Berliner Klinische Wochenschrift**, v. 27, p. 464-467, 1890.
- BENTUBO, H. D, L; GAMBALE, W; FISCHMAN, O. Caracterização laboratorial e comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, 2013.
- BENTUBO, H. D. L.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNAses by different species of *Trichosporon*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 377-387, 2014.
- BEURMANN, L.; GOUGEROT, H. AND VAUCHER, H. Oidiomycose gommeuse, ulcéreuse, disséminée. Mycose nouvelle, due à un parasite nouveau: l'Oidium cutanéum (ancien groupe des Blastomycoses). **Revue de Médecine Interne**, v. 30, p. 937-958, 1940.
- BIYUN, Li et al. Risk factors for invasive fungal infections after haematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 30, n. 5, p. 601-610, 2024.
- BLANKENSHIP, J. R.; STEIBACH, W. J.; PERFECT, J. R., HEITMAN, J. Teaching old drugs new tricks: reincarnating immunosuppressants as antifungal drugs. **Current Opinion in Investigational Drugs**. v. 4, p. 192-199, 2003.
- BONGOMIN, F. et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
- BRAGA, P. R. et al. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 273-277, 2018.
- BRILHANTE, R, SN et al. An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans* sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato. **Mycoses**, v. 60, n. 10, p. 697-702, 2017.
- BURNIE, J. P.; CARTER, T. L.; HODGETTS, S. J.; MATTHEWS. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, p. 53-88, 2006.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. Antifungals, Biochemical **Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2016.
- CANO-PALLARES, C. et al. Piedra blanca y otras infecciones causadas por *Trichosporon* spp. **Dermatología Revista Mexicana**, v. 60, n. 6, p. 499-507, 2016.
- CARVALHO, M.H.G.F et al. L-dihidroxyphenylalanine induces melanin 74 production by members of the genus *Trichosporon*. **FEMS yeast research**; v.14; n.6; p. 988- 991. 2014.
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), **Fungal Diseases**. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/cdc-and-fungal/burden.html>. Acesso em 07 de março de 2023.

CENTRS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (US). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. **Centres for Disease Control and Prevention**, US Department of Health and Human Services, 2013.

CESARO, Simone et al. Retrospective study on the incidence and outcome of proven and probable invasive fungal infections in high-risk pediatric onco-hematological patients. **European journal of haematology**, v. 99, n. 3, p. 240-248, 2017.

CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the Genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166, p. 121-132, 2008.

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

CHALLAPILLA, M. et al. *Trichosporon*–Blood Stream Infection. **Journal of The Association of Physicians of India**, v. 67, p. 19, 2019.

CHANG, Y et al. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v.8, p. 222-236, 2017.

CHEN, S. C. A.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. Direct effects on non-antifungal agents used in cancer chemotherapy and organ transplantation on the development and virulence of *Candida* and *Aspergillus* species. **Virulence**, v. 2, n. 4, p. 280-295, 2011.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Biological crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12-21, 2010.

CHEN, X. et al. Antifungal effects and potential mechanisms of lonidamine in combination with fluconazole against *Candida albicans*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 1, p. 109-115, 2021.

CHEN, Y.; BRAND, A.; MORRISON, E. L.; SILAO, F. G.; BIGOL, U. G.; MALBAS, F. F. J.; NETT, J. E.; ANDES, D. R.; SOLIS, N. V.; FILLER, S. G.; AVERETTE, A.; HEITMAN, J. Calcineurin controls drug tolerance, hyphal growth, and virulence in *Candida dubliniensis*. **Eukariotic Cell**. v. 10, p. 803-819, 2011.

CHEN, YL et al. On the roles of calcineurin in fungal growth and pathogenesis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, p. 244-255, 2010.

CHEVEREAU, G; BOLLENBACH, T. Systematic discovery of drug interaction mechanisms. **Molecular systems biology**, v. 11, n. 4, p. 807, 2015.

CHITASOMBAT, Maria N. et al. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. **Journal of Infection**, v. 64, n. 1, p. 68-75, 2012.

CHO, O.; MATSUKURA, M.; SUGITA, T. Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. **International Journal of Infection Diseases**, v. 38, p. 87- 88, 2015.

CIMOLAI, N. Laboratory diagnosis of bacterial infections. **CRC Press**, 2001.

CLEARE, Levi G.; ZAMITH-MIRANDA, Daniel; NOSANCHUK, Joshua D. Heat shock proteins in *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 11, p. e00221-17, 2017.

- CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth informational supplement**. M27S4ed. WAYNE, PA. Standard by Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 219-138, 2014.
- COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 682-700, 2011.
- COOKSON, R.; POVERLEIN, C.; LACHS, J.; BARRET, A. G. M. Synthetic Studies towards Radicol Biomimetic Macrolactonization and Transannular Aromatization Reactions. **Eur J Org Chem**, n. 21, p. 4523-4535, 2014.
- CORDEIRO, R. A et al. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v.64, p. 1277-1286, 2015.
- CORDEIRO, R. A. et al. Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 309-317, 2016.
- CORDEIRO, R. A. et al. The calcineurin inhibitor cyclosporin A exhibits synergism with antifungals against *Candida parapsilosis* species complex. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n. 7, p. 936-944, 2014.
- CORDEIRO, R. A. et al. *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 645812, 2021.
- CORDEIRO, R. A. et al. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1277-1286, 2015.
- COWEN L. E.; CARPENTER, A. E.; MATANGKASOMBUK, O.; FINK, G.R.; LINDQUIST, S. Genetic architecture of Hsp90-dependent drug resistance. **Eukaryot Cell**, v. 5, p. 2184-2188, 2006.
- COWEN, L. E. et al. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 8, p. 2818-2823, 2009.
- COWEN, L. E.; LINDQUIST, S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. **Science**, v. 309, n. 5744, p. 2185-2189, 2005.
- COX, G. M.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon* species. Topley and Wilson's **Microbiology and Microbial Infections**, 9th ed. London: Arnold Press. p, p. 461-484, 1997.
- CRABTREE, Gerald R.; SCHREIBER, Stuart L. SnapShot: Ca<sup>2+</sup>-Calcineurin-NFAT Signaling. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 210-210. e1, 2009.
- CRUZ, M. C.; GOLDSTEIN, L.; BLANKENSHIP, R.; DEL-POETA, M.; DAVIS, D.; CARDENAS, M. E.; PERFECT, J. R.; MCCUSKER, J. H.; HEITMAN, J. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. **EMBO Journal**. v. 21, p. 546-559, 2002.

- DABAS, Y; XESS, I; KALE, P. Molecular and antifungal susceptibility study on trichosporonemia and emergence of *Trichosporon* mycotoxinivorans as a bloodstream pathogen. **Medical Mycology**, v. 55, n. 5, p. 518-527, 2017.
- DAI, B.; WANG, Y.; LI, D.; XU, Y.; LIANG, R.; ZHAO, L.; CAO, Y.; JIA, J.; JIANG, Y. Hsp90 is involved in apoptosis of *Candida albicans* by regulating the calcineurin-caspase apoptotic pathway. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012.
- DAY, J. N. et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *New England Journal of Medicine*, v. 368, n. 14, p. 1291-1302, 2013.
- DE HOOG, G. S et al. **Atlas of clinical fungi**. 2th ed., Guanabara, Rio de Janeiro, 2000.
- DENNING, David W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. e428-e438, 2024.
- DI BONAVENTURA, G et al. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture and antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n.10, p. 3269-3276, 2006.
- DOERN, Christopher D.; RICHARDSON, Susan E. Diagnosis of urinary tract infections in children. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2233-2242, 2016.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.
- DUARTE-OLIVEIRA, C. et al. The cell biology of the *Trichosporon*-host interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 118, 2017.
- EICKHOFF, Michaela J.; DUMM, Rebekah E. The Brief Case: Tricky *Trichosporon asahii* in the urinary tract. **Journal of clinical microbiology**, v. 62, n. 9, p. e00557-24, 2024.
- ENOCH, D. A. et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections. In: *Human Fungal Pathogen Identification*. **Humana Press**, New York, NY, 2017. p. 17-65.
- ESSER, K.; KURZAI, O. Human Fungal Pathogens. **In: The Mycota**. 2 ed. London: Springer, vol. 12, 2014. 298 p.
- EVANGELISTA, Antonio José de Jesus. **Efeito do bloqueio das proteínas hsp90 sobre a sensibilidade a antifúngicos e produção de fatores de virulência no complexo *Cryptococcus neoformans/C. Gattii***. 2015.
- FAGUNDES JÚNIOR, A. A. P. et al. Emergência de infecção por *Trichosporon asahii* em pacientes portadores de insuficiência cardíaca em unidade de terapia intensiva cardiológica: relato de caso e revisão da literatura. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2008.
- FANG, W. et al. Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. **Journal of biomedical science**, v. 30, n. 1, p. 42, 2023.
- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.
- FERNÁNDEZ-GRANDA, Ignacio et al. Infection by *Trichosporon Inkin* in Lung Transplant: Rare Infection, or Not So Rare?. In: **Transplantation Proceedings**. Elsevier, 2025.

- FERREIRA, F. R et al. Piedra Branca por *Trichosporon* ovoides no Sudeste do Brasil: Relato e Breve Revisão da Literatura. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 77, n. 2, p. 157-160, 2019.
- FERRUCIO, M. R. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.
- FIORI, A.; KUCHARÍKOVÁ, S.; GOVAERT, G.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.; DIJCK, P. V. The heat-induced molecular disaggregase Hsp104 of *Candida albicans* plays a role in biofilm formation and pathogenicity in aworm infection model. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 8, p. 1012-1020, 2012.
- FLEMMING, Hans-Curt et al. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 70-86, 2023.
- 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.; DE TARSO O CASTRO, P.; GUIMARÃES, T.; HAHN, R. C.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 25, n. 7, 2019.
- FREGONEZI, N. F. et al. Heat shock protein 60, insights to its importance in *Histoplasma capsulatum*: From biofilm formation to host-interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 591950, 2021.
- FURLANETO-MAIA, L. et al. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2007.
- GAETANO, Silvia et al. *Candida auris* outbreaks: current status and future perspectives. **Microorganisms**, v. 12, n. 5, p. 927, 2024.
- GALDIERO, E. et al. Eradication of *Candida albicans* persister cell biofilm by the membranotropic peptide gH625. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.
- GARCÍA-CARNERO, L. C. et al. The heat shock protein 60 and Pap1 participate in the *Sporothrix schenckii*-host interaction. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 960, 2021.
- GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.
- GIRMENIA, C. et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1818-1828, 2005.
- GIRMENIA, Corrado et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1818-1828, 2005.
- GROSS, J. W.; KAN, V. L. *Trichosporon asahii* infection in an advanced AIDS patient and literature review. **Aids**, v. 22, n. 6, p. 793-795, 2008.
- GUÉHO, E et al. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**, v. 37, p. 3-10, 1994.

- GUÉHO, E.; DE HOOG, G.S. AND SMITH, M.T.H. Neotypification of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 61, p. 285-289, 1992.
- GUO, Li-Na et al. Invasive infections due to *Trichosporon*: species distribution, genotyping, and antifungal susceptibilities from a multicenter study in China. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 2, p. 10.1128/jcm. 01505-18, 2019.
- GUO, LI-NA; YU, SHU-YING; HSUEH, PO-REN; AL-HATMI, ABDULLAH M. S.; MEIS, J. F.; HAGEN, F.; XIAO, M.; WANG, HE.; BARRESI, C.; ZHOU, MENG-LAN; SYBREN DE HOOG, G.; XU, YING-CHUN. Invasive Infections Due to *Trichosporon*: species distribution, Genotyping, and antifungal, susceptibilities from a multicenter study in China. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 57, nº 2, 2019.
- HARTL, F. Ulrich; BRACHER, Andreas; HAYER-HARTL, Manajit. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324-332, 2011.
- HILL, J. A.; COWEN, L. E. Using combination therapy to thwart drug resistance. **Future microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1719-1726, 2015.
- HOENIGL, Martin et al. Novel antifungals and treatment approaches to tackle resistance and improve outcomes of invasive fungal disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. e00074-23, 2024.
- HON, Kam Lun Ellis et al. Invasive fungal infections in critically ill children: epidemiology, risk factors and antifungal drugs. **Drugs in Context**, v. 13, p. 2023-9-2, 2024.
- HOY, J. et al. *Trichosporon beigeli* Infection: A Review. **Reviews of infectious diseases**, v. 8, n. 6, p. 959-967, 1986.
- ICHIKAWA, T. et al. Structural studies of a cell wall polysaccharide of *Trichosporon asahii* containing antigen II. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 19, p. 5098-5106, 2001.
- INÁCIO, C. P. **Modelo de infecção in vitro da pedra branca, análise dos aspectos morfológicos, ultraestruturais e abordagem de identificação polifásica dos agentes etiológicos**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- ITURRIETA-GONZÁLEZ, I. A et al. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109553, 2014.
- IZUMI, K.; HISATA, Y.; HAZAMA, S. A rare case of infective endocarditis complicated by *Trichosporon asahii* fungemia treated by surgery. **Annals of thoracic and cardiovascular surgery: official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia**, v. 15, n. 5, p. 350-353, 2009.
- JIMENEZ, Márcia Gabriele de Souza et al. Characterization of Virulence Factors, Cellular Stress Response, and Antifungal Susceptibility Testing of *Trichosporon* spp. Isolated from Northeast Brazilian Patients. **Journal of Fungi**, v. 11, n. 4, p. 255, 2025.
- JUVVADI, P. R. et al. Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 186-197, 2017.

- KAMPINGA, H. H. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, n. 1, p. 105-111, 2009.
- KARA, Aybüke Akaslan et al. Bloodstream infections due to *Trichosporon* species in paediatric patients: Results from the first national study from Turkey. **Journal of Medical Mycology**, v. 32, n. 1, p. 101229, 2022.
- KIMURA, M. et al. Factors associated with breakthrough fungemia caused by *Candida*, *Trichosporon*, or *Fusarium* species in patients with hematological disorders. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. e02081-21, 2022.
- KING, A. M. et al. Aspergillomarasmine A overcomes metallo- $\beta$ -lactamase antibiotic resistance. **Nature**, v. 510, n. 7506, p. 503-506, 2014.
- KONEMAN E.W et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Medsi. 2001.
- KOURTI, Maria; ROILIDES, Emmanuel. Invasive trichosporonosis in neonates and pediatric patients with malignancies or hematologic disorders. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 242, 2022.
- KRCMERY JR, V. et al. Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. **Supportive Care in Cancer**, v. 7, n. 1, p. 39-43, 1999.
- KREITMANN, Louis; BLOT, Stijn; NSEIR, Saad. Invasive fungal infections in non-neutropenic patients. **Intensive Care Medicine**, p. 1-5, 2024.
- KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold spring harbor protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095505, 2018.
- KURAKADO, Sanae et al. Role of arthroconidia in biofilm formation by *Trichosporon asahii*. **Mycoses**, v. 64, n. 1, p. 42-47, 2021.
- LACAZ, C. S. et al. **Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.
- LAGREE, K.; MITCHELL, A. P. Biofilmes Fúngicos: Inside Out. **Espectro Microbiológico**, v. 5, n. 2 de 2017.
- LAMOTH, F.; PRAVEEN, R. J.; JARROD, R. F.; WILLIAM, J. S. Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 11, p. 1324-1332, 2012.
- LARA, Bruna Rossini et al. Aspects related to biofilm production and antifungal susceptibility of clinically relevant yeasts of the genus *Trichosporon*. **Medical Mycology**, v. 61, n. 3, p. myad022, 2023.
- LASS-FLÖRL, Cornelia et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 10, n. 1, p. 20, 2024.
- LEAF, H. L.; SIMBERKOFF, M. S. Invasive trichosporonosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 160, n. 2, p. 356-357, 1989.
- LEE, C. H.; HONG, H. M.; CHANG, Y. Y.; CHANG, W. W. Inhibition of heat shock protein (Hsp) 27 potentiates the suppressive effect of Hsp90 inhibitors in targeting breast cancer stem-like cells. **Biochimie**, v. 94, n. 6, p. 1382-1389, 2012.

- LEVIN, A. S. S. Guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares. In: **Guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares**. 2007. p. 191-191.
- LI, H.; GUO, M.; WANG, C.; LI, Y.; FERNANDEZ, A.M.; FERRARO, T.N.; YANG, R.; CHEN, Y. Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past 23 years. **Epidemiology & Infection**, v. 148, p. e169. 2020.
- LI, Wanqian et al. Calcium-calcineurin signaling pathway in *Candida albicans*: A potential drug target. **Microbiological research**, v. 249, p. 126786, 2021.
- LI, Y. et al. In vitro interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time–kill curves. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 577-585, 2008.
- LIAO, Y et al. Epidemiology and outcome of *Trichosporon* fungemia: A review of 185 reported cases from 1975 to 2014. **Open Forum Infect. Dis.**, v. 2, n. 4, p.141, 2015.
- LIMA, Yasmim Passos; DIAS, Vanessa Cordeiro. *Trichosporon* spp.: what's new?. **Future Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 373-375, 2024.
- LIU, J.; ALBERS, M. W.; WANDLESS, T. J.; LUAN, S.; ALBERG, D. G.; BELSHAW, P. J.; COHEN, P.; MACKINTOSH, C.; KLEE, C. B.; SCHREIBER, S. L. Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. **Biochemistry**. v. 31, p. 3896-901, 1992.
- LIU, X.Z et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Studies in Mycology**, v. 81, p.85–147, 2015
- LOPES, P. S. G. **Identificação de candidatos vacinais em potencial para *Trichosporon asahii* por vacinologia reversa**. 2018. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2018.
- MA, Xiaoping et al. *Trichosporon asahii* PLA2 gene enhances drug resistance to azoles by improving drug efflux and biofilm formation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 8855, 2023.
- MADIGAN, M. T et al. **Microbiologia de Brock**. 10a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MADRIGAL-MATUTE, J.; FERNANDEZ-GARCIA, C. E.; GOMEZ-GUERRERO, C.; LOPEZ-FRANCO, O.; MUÑOZ-GARCIA, B.; EGIDO, J.; BLANCO-COLIO, L. M.; MARTIN-VENTURA, J. L. Hsp90 inhibition by 17-DMGA attenuates oxidative stress in experimental atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v. 95, p. 116-123, 2012.
- MAGALHÃES, A. R. **Caracterização Morfológica E Bioquímica de isolados Clínicos de *Trichosporon* spp.** no Rio De Janeiro. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.
- MAHMOUD, Dorra Elhaj et al. The epidemiology of invasive fungal infections in transplant recipients. **Biomedical journal**, v. 47, n. 3, p. 100719, 2024.
- MAKI, Dennis G.; WEISE, Carol E.; SARAFIN, Harold W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **New England Journal of Medicine**, v. 296, n. 23, p. 1305-1309, 1977.

- MALACRIDA, A. M.; SALCI, T. P.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Insight into the antifungals used to address human infection due to *Trichosporon* spp.: a scoping review. **Future Microbiology**, 2021.
- MARDANI, Masoud. Change in Global Incidence and Mortality of Invasive Fungal Infection. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, 2024.
- MARINÉ, M et al. On and under the skin: emerging basidiomycetous yeast infections caused by *Trichosporon* species. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004982, 2015a.
- MARINÉ, M; BOM, V. L. P.; CASTRO, P. A.; Winkelstroter, L. K.; RAMALHO, L. N.; BROWN, N. A.; GOLDMAN, G. H. The development of animal infection models and antifungal efficacy assays against clinical isolates of *Trichosporon asahii*, *T. asteroides* and *T. inkin*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 476-486, 2015b.
- MARTÍNEZ-NAVARRETE, M. et al. Cyclosporin A-loaded dissolving microneedles for dermatitis therapy: Development, characterisation and efficacy in a delayed-type hypersensitivity in vivo model. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 14, n. 12, p. 3404-3421, 2024.
- MARTINS M.; UPPULURI P.; THOMAS D. P.; CLEARY I. A.; HENRIQUES M.; LOPEZRIBOT J. L.; OLIVEIRA R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, 2010.
- MATTEDE, M. G. S et al. Infecções urinárias causadas por *Trichosporon* spp. em pacientes graves internados em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 27, n. 3, p. 247-251, 2015.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; JACOBSEN, I. D.; MIRAMÓM, P.; SLESIONA, S.; BOHOVYCH, I. M.; BROWN, A. J. P.; HUBE, B. Small but crucial: the novel small heat shock protein Hsp21 mediates stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. **PloS One**, v. 7, n. 6, p. 1-20, 2012.
- MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 103-124, 2016.
- MERSEGUEL, K. B et al. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 57, p. 1-11, 2015.
- MERSEGUEL, K. B et al. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 57, p. 1-11, 2015.
- MESSIAS SILVESTRE A.J et al. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a Brazilian population. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41, 628-634, 2010.
- MILAN, E. P.; SILVA-ROCHA, W. P.; ALMEIDA, J. J. S.; FERNANDES, T. U. G. PRUDENTE, A. L. de A.; AZEVEDO, M. F.; FRANCISCO, E. C.; MELO, A. S. de A.; COLOMBO, A. L.; CHAVES, G. M. *Trichosporon inkin* meningitis in Northeast Brazil: first case report and review of the literature. **BMC Infectious Diseases**, 2018.
- MIRGHANI, Ruba et al. Biofilms: Formation, drug resistance and alternatives to conventional approaches. **AIMS microbiology**, v. 8, n. 3, p. 239, 2022.

- MIYATA, Y.; NAKAMOTO, H.; NECKERS, L. The therapeutic target hsp90 and cancer hallmarks. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 3, p. 347-365, 2013.
- MONTOYA, A. M. et al. Cytokines profile in immunocompetent mice during *Trichosporon asahii* infection. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p. 103-109, 2018.
- MONTOYA, Alexandra M. et al. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 1, p. 22-26, 2018.
- NICHELE, S. M.; ZIMMERMANN, E. S.; BRUCKER, N. Monitoramento terapêutico de voriconazol no manejo de infecções fúngicas invasivas. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 20, n. 2, p. 581-590, 2019.
- NICOLA, A. M.; ANDRADE, R. V.; DANTAS, A. S.; ANDRADE, A. A.; ARRAES, F. B. M.; FERNANDES, L.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M. S. S. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. **BMC Microbiol**, v. 8, 2008.
- NOBREGA DE ALMEIDA JR, João et al. Epidemiology, clinical aspects, outcomes and prognostic factors associated with *Trichosporon* fungaemia: results of an international multicentre study carried out at 23 medical centres. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 7, p. 1907-1915, 2021.
- NUCCI, M.; MARR, Kieren A. Emerging fungal diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 4, p. 521-526, 2005.
- ONYEWU, C.; AFSHARI, N. A.; HEITMAN, J. Calcineurin promotes infection of the cornea by *Candida albicans* and can be targeted to enhance fluconazole therapy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, p. 3963-3965, 2006.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 9, p. 719-727, 2010.
- PADOVAN, A. C. B. et al. Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 133, p. 103267, 2019.
- PAGANO, L.; MAYOR, S.. Invasive fungal infections in high-risk patients: report from TIMM-8 2017. **Future scienc**, v. 4, 2018.
- PAPON, N et al. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm, **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, 2013.
- PAPON, N.; BOUGNOUX, M.E.; D'ENFERT, C. Tracing the Origin of Invasive Fungal Infections. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 240-242. 2020.
- PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.
- PARAHYM, A. M. R. C. **Infecções fúngicas nosocomiais em unidade de terapia intensiva: ocorrência e controle**. 2016. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- PATEL, Hiral; BUCHAD, Hasmatbanu; GAJJAR, Devarshi. *Pseudomonas aeruginosa* persist cell formation upon antibiotic exposure in planktonic and biofilm state. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 16151, 2022.

- PEETERS, E.; NELIS, H.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**. v. 72, n. 2, p. 157-165, 2008.
- PEREIRA, D. N. et al. Disseminated *Trichosporon* spp infection in preterm newborns: a case report. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85, n. 5, p. 459-461, 2009.
- PEREIRA, L. M. G. **Papel do DNA extracelular sobre a estrutura e resposta a antifúngicos em biofilmes de Trichosporon asahii e T. inkin formados em meio simulador de urina e RPMI 1640**. 2022.
- PEREIRA, R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of applied microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.
- PEREIRA, T. C. D.; BARROS, R. A. M. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **Facider**, v. 1, n. 1, 2012.
- PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.
- PERUSINHA, C. G; ROSADO, C.; LENCASTRE, A. Novos Avanços no Tratamento da Onicomicose. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 77, n. 3, p. 239-243, 2019.
- PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M. Nosocomial candidiasis: antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. **Medical mycology**, v. 54, n. 1, p. 1-22, 2015.
- PILLAI, SHARANYA et al. Risk Factors, Diagnosis and Outcome of Proven and Probable Invasive Trichosporonosis in a Tertiary Care Hospital: A Cross-sectional Analytical Study. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 18, n. 12, 2024.
- PISTORI, R. P. Endocardite fúngica por *Trichosporon asahii*: relato de um caso raro em imunocompetentes. **Revista/Suplemento da SOCESP**, v. 29, n. 1, p. 100-103, 2019.
- PONTES, Z. B. V. S. et al. Clinical and mycological study of scalp white piedra in the state of Paraíba, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 747-750, 2002.
- PREYER, Linda et al. Effectiveness of high efficiency particulate (HEPA) air condition combined with the antifungal prophylaxis on incidence, morbidity and mortality of invasive fungal infections in patients with acute myeloid leukemia: a retrospective single-center study. **Frontiers in Oncology**, v. 14, p. 1429221, 2024.
- RAMAGE, G et al. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-14, 2012.
- RAMAGE, G. et al. Our current understanding of fungal biofilms. *Critical reviews in microbiology*, v. 35, n. 4, p. 340-355, 2009.
- RITOSSA F. 1996. Discovery of the heat shock response. **Cell Stress & Chaperones** 1, 97.
- RIVERA, R; CANGIR, A. *Trichosporon* sepsis and leukemia. **Cancer**, v. 36, n. 3, p. 1106-1110, 1975.

- ROBBINS, N.; UPPULURI, P.; NETT, J.; RAJENDRAN, R.; RAMAGE, G.; LOPEZRIBOT, J. L.; ANDES, D.; COWEN, L. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of biofilms. **Plos Pathog**, v. 7, n.9, 2011.
- ROBBINS, N.; WRIGHT, G.D; COWEN, L.E. Antifungal Drugs: The current armamentarium and development of new agents. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.5, p. FUNK 0002-2016, 2016.
- ROSEN, T. et al. Onychomycosis: epidemiology, diagnosis, and treatment in a changing landscape. **Journal of Drugs in Dermatology: JDD**, v. 14, n. 3, p. 223-233, 2015.
- RUAN, Minyan; LIN, Jie. Freight Emission Modeling Framework Phase One: Generating County-Level Freight Data Using Public Sources. In: **Transportation, Land Use, Planning, and Air Quality: Selected Papers of the Transportation, Land Use, Planning, and Air Quality Conference 2009**. 2009. p. 11-18.
- RUHNKE, M.; BEHRE, G.; BUCHHEIDT, D.; CHRISTOPEIT, M.; HAMPRECHT, A.; HEINZ, W. et al. Diagnosis of invasive fungal diseases in haematology and oncology: 2018 update of the recommendations of the infectious diseases working party of the German society for hematology and medical oncology (AGIHO). **Mycoses**, v. 61, n. 11, p. 796-813. 2018.
- SANGUINETTI, M. et al. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. Supplement\_2, p. ii27-ii37, 2019.
- SANTOS, F. AG et al. *Trichosporon inkin* fungemia case report: clinical and laboratory management. **Future Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 81-87, 2022.
- SANYAOLU, Adekunle et al. *Candida auris*: an overview of the emerging drug-resistant fungal infection. **Infection & chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 236, 2022.
- SCHMID, T. E.; MULTHOFF, G. Radiation-induced stress proteins - the role of heat shock proteins (HSP) in anti-tumor responses. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 12, p. 1765-1770, 2012.
- SCHWARZ, Kelly et al. Hsp70/Hsp90 organising protein (Hop): coordinating much more than chaperones. **The Networking of Chaperones by Co-Chaperones**, p. 81-125, 2022.
- SHABAAN, A. E. et al. Role of serum (1, 3)- $\beta$ -d-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 94, n. 5, p. 559-565, 2018.
- SHAPIRO, R. S.; COWEN, L. E. Coupling temperature sensing and development: Hsp90 regulates morphogenetic signalling in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 1, n. 1, 2010.
- SHAPIRO, R. S.; COWEN, L. E. Thermal control of microbial development and virulence: molecular mechanisms of microbial temperature sensing. **MBio**, v. 3, n. 5, 2012.
- SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

- SHAPIRO, R. S.; UPPULURI, P.; ZAAS, A. K.; COLLINS, C.; SENN, H.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J.; COWEN, L. E. Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. **Curr Biol**, v. 19, n. 8, 2009.
- SHAPIRO, R. S.; ZAAS, A. K.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. The Hsp90 Co-Chaperone Sgt1 Governs *Candida albicans* Morphogenesis and Drug Resistance. **Plos One**, vol. 7, n. 9, 2012.
- SHARMA, Satish et al. Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1614, 2023.
- SHINDE, R. B.; CHAUHAN, N. M.; RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 11, 2012.
- SHINDE, R. B.; CHAUHAN, N. M.; RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 11, 2012.
- SHREE, Pallee et al. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. **Medicine in Microecology**, v. 16, p. 100084, 2023.
- SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Média à Luz dos Autores Contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.
- SILVA, B. N. **Efeito da vancomicina sobre o crescimento e a virulência de células planctônicas e biofilmes de Trichosporon spp.** 2020.
- SILVA, Bruno Nascimento da et al. Inhibition of calcineurin as a strategy for biofilm control: *Trichosporon* spp. as a case study. **Biofouling**, p. 1-12, 2025.
- SILVA, R. B. **Candidemia em um hospital público do nordeste do Brasil: características epidemiológicas e fatores de risco em pacientes críticos**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- SILVESTRE JUNIOR, A. Me.; MIRANDA, M. A. B. R.; CAMARGO, Z. P. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a Brazilian population. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 628-634, 2010.
- SINGH, S. D.; ROBBINS, N.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 7, 2009.
- SINGH, S.; CAPOOR, M.R.; VARSHNEY, S.; GUPTA, D.K.; VERMA, P.K.; RAMESH, V. Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Infections Caused by *Trichosporon* Species: An Emerging Non-*Candida* and Non-*Cryptococcus* Yeast Worldwide. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 536-541. 2019.
- SOMENZI, C. C; RIBEIRO, T. S.; MENEZES, A. Características particulares da micologia clínica e o diagnóstico laboratorial de micoses superficiais. **NewsLab**, v. 77, p. 106-18, 2006.
- SPRUTE, R. et al. EQUAL *Trichosporon* Score 2022: an ECMM score to measure QUALity of the clinical management of invasive *Trichosporon* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 6, p. 1779-1784, 2022.

- STEINBACH, W. J.; CRAMER, R. A.; PERFECT, B. Z.; ASFAW, Y. G.; SAUER, T. C. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**. v. 5, p. 1091-1103, 2006.
- STEINBACH, W. J.; REEDY, J. L.; CRAMER, R. A. J.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. **Nature Reviews Microbiology**. v. 5, p. 418-430, 2007.
- STEPANOVIĆ, Srdjan et al. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- STIE, J.; FOX, D. Calcineurin regulation in fungi and beyond. **Eukaryotic Cell**. v. 7, p. 177- 186, 2008.
- STRICKLAND, Ashley B.; SHI, Meiqing. Mechanisms of fungal dissemination. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, p. 3219-3238, 2021.
- SUZUKI, K. et al. Fatal *Trichosporon fungemia* in patients with hematologic malignancies. **European journal of haematology**, v. 84, n. 5, p. 441-447, 2010.
- TAIPALE, M.; JAROSZ, D. F.; LINDQUIST, S. Hsp90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. **Nat Rev Mol Cell Bio**, v. 11, n. 7, p. 515-528, 2010.
- TAMAYO, D.; MUÑOZ, J. F.; TORRES, I.; ALMEIDA, A. J.; RESTREPO, A.; MECEWEN, J. G.; HERNÁNDEZ, O. Involvement of the 90 kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* to different environmental conditions. **Fungal Genet Biol**, 2012.
- TAMBE, S. A. et al. Two cases of scalp white piedra caused by *Trichosporon ovoides*. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 75, n. 3, p. 293, 2009.
- TAVERNA, C. G et al. Molecular Identification, Genotyping, and Antifungal Susceptibility Testing of Clinically Relevant *Trichosporon* Species from Argentina. **Medical Mycology**, v. 52, n. 4, p. 356–366, 2014.
- ULENGIN-TALKISH, Idil; CYERT, Martha S. A cellular atlas of calcineurin signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1870, n. 1, p. 119366, 2023.
- UPPULURI, P. et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 3, p. e1000828, 2010.
- UPPULURI, P.; NETT, J.; HEITMAN, J.; ANDES, D. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, p. 1127-1132, 2008.
- VINCENT, B. M et al. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. **PLoS Biol**, v. 11, n. 10, p. e1001692, 2013.
- WALSH, T. J. et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 48-66, 2004.
- WANG, Dandan et al. Fungal biofilm formation and its regulatory mechanism. **Heliyon**, v. 10, n. 12, 2024.
- WANG, H et al. A Comprehensive Evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS MatrixAssisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry

- Systems for Identification of Yeasts, Part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study, 2012 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n.5, p. 1376–1380, 2016.
- WANG, Xiaodong et al. Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 803-815, 2006.
- WATSON, K. C. KALLICHURUM, *S. cutaneum*. **Journal of medical microbiology**, v. 3, n. 1, p. 191-193, 1970.
- WEBB, B. J. et al. Epidemiology and clinical features of invasive fungal infection in a US health care network. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2018. p. ofy187.
- WHITESELL, L.; SANTAGATA, S.; NU, L. Inhibiting Hsp90 to treat cancer: a strategy in evolution. **Curr Mol Med**, v. 12, n. 9, p. 1108-1124, 2012.
- WOOD, T. K. Strategies for combating persister cell and biofilm infections. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1054-1056, 2017.
- WU, Yongqin. A rare case of *Trichosporon inkin* bloodstream infection in an immunocompetent patient: Diagnostic challenges and antigenic cross-reactivity. **Decoding Infection and Transmission**, v. 3, p. 100043, 2025.
- XIE, J. L. et al. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**. vol. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.
- YADAV, Vikas; HEITMAN, Joseph. Calcineurin: The Achilles' heel of fungal pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 7, p. e1011445, 2023.
- ZHANG, Bin et al. The calcineurin–NFAT pathway allows for urokinase receptor-mediated beta3 integrin signaling to cause podocyte injury. **Journal of molecular medicine**, v. 90, p. 1407-1420, 2012.
- ZHANG, M. et al. Antifungal activity of immunosuppressants used alone or in combination with fluconazole. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1304-1317, 2019.
- ZHENG, Lijun et al. Susceptibility to caspofungin is regulated by temperature and is dependent on calcineurin in *Candida albicans*. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 6, p. e01790-23, 2023.
- ZIMBRES, A. C. G. et al. A glucuronoxylomannan-like glycan produced by *Trichosporon mucoides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 121, p. 46-55, 2018.
- ZIMMERMANN, G. R.; LEHAR, J; KEITH, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. **Drug discovery today**, v. 12, n. 1-2, p. 34-42, 2007.

## ANEXOS

### Anexo 1. Ficha de coleta de dados dos prontuários clínicos

<b>1. DADOS INICIAIS GERAIS:</b>	
Nº DA FICHA:	
DATA DA COLETA DO ESPÉCIME CLÍNICO:	
Nº ATENDIMENTO/PEDIDO:	
INICIAIS DO PACIENTE:	
UNIDADE NO MOMENTO DA DETECÇÃO DO ISOLADO DE INTERESSE:	
AMOSTRA:	
MICROORGANISMO (S) ISOLADO (S):	
VOLUME (S) DO PRONTUÁRIO DA COLETA DE DADOS DO PACIENTE:	

<b>2. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:</b>	
NOME:	
PRONTUÁRIO:	
DATA DE NASCIMENTO:	IDADE:
SEXO: M ( ) F ( )	
PESO:	
NOME DO RESPONSÁVEL:	

<b>3. INTERNAÇÃO:</b>	
a. GERAL:	
i. Não necessitou de internação ( ).	
ii. Necessitou de internação: ( )	
Data de admissão e alta hospitalar:	
Data de admissão e transferência hospitalar:	
Data de admissão e óbito hospitalar:	
Tempo de internação:	
b. CORONAVÍRUS SARS-CoV2 (COVID-19) (O primeiro caso foi em 26/02/2020):	
Fez teste para COVID-19: Sim ( ), Não ( ) ou Não mencionado.	

Resultado:	
Qual teste?	
Data:	
c. MOTIVO DA INTERNAÇÃO:	
i. Quadro infeccioso: ( )	
1) Local de aquisição da infecção:	
Infecção comunitária ( )	Infecção hospitalar ( )
2) Tipo de infecção:	
Infecção sistêmica: ( )	Outro foco infeccioso: ( ) Qual?
ii. Relacionada à doença de base (Doença prévia): ( )	
Câncer (Especificar):	
Neuropatia:	
Fibrose cística:	
Outra:	
iii. Realização de exames de diagnóstico:	
iv. Cirúrgica:	
v. Tratamento:	
d. UNIDADE DA INTERNAÇÃO:	
Enfermaria:	UTI:
Clínico:	Cirúrgica:
Outro:	

**4. SINAIS E SINTOMAS (Durante o 1º isolamento fúngico em vigência da admissão ou no percurso da internação):**

a. GERAL:

Febre (Indicar):	Instabilidade térmica:
Calafrios:	
Hipotensão (Pressão sistólica $\leq$ 90 mmHg) (indicar):	Frequência cardíaca (F.C.):
Pressão Arterial Média (P.A.M) (Sistólica + 2x diastólica / 3):	Alterações da circulação periférica:
Nível de saturação de oxigênio (SAT. O <sup>2</sup> ):	
Hipoglicemia (Pelo menos três averiguações) - Dx:	
Manifestações cutâneas (Petéquias, exantema, rash, etc):	
Convulsões (Nº de episódios):	
Alteração do nível de consciência:	
Outro:	
<b>b. RELACIONADA À INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO:</b>	
Dor ou desconforto suprapúbico:	Dor ou desconforto lombar:
Disúria (Micção dolorosa [queimação]):	Oligúria (Redução do volume urinário):
Urgência miccional:	Aumento da frequência miccional:
<b>c. RELACIONADA À INFECÇÃO DE SÍTIO CIRÚRGICO:</b>	
Dor:	Edema local:
Edema local:	Hiperemia ou calor localizado:
Aumento da Sensibilidade:	Drenagem purulenta pela incisão superficial:
<b>e. OUTRO:</b>	

<b>5. FATORES DE RISCO:</b>
a. TIPO DE PACIENTE:
Paciente clínico: ( )
Paciente cirúrgico: ( ). Qual?
b. COMORBIDADES AO DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO:
i. Sem comorbidades: ( )
ii. Com comorbidades: ( )
- Doença autoimune ( ). Qual?
- Cardiopatia ( ). Qual?
- Pneumopatia ( ). Qual?
- Hepatopatia ( ). Qual?
- Neoplasia ( ):
Tumor sólido:
Linfoma:
Leucemia:
- Outra ( ). Qual?
c. CONDIÇÃO DO IMUNOLÓGICA DO PACIENTE:
i. Imunodepressão (Mecanismos normais de defesa contra infecções estão comprometidos, curso de certas doenças, como câncer, AIDS etc.):
1) Não-imunodeprimido: ( )
2) Imunodeprimido: ( )
Neutropenia:
Neoplasia hematológica (Com ou sem quimioterapia):
HIV + com CD4 < 200:
Transplantados:
Asplenia (Funcional ou anatômica):
Doenças autoimune (Lúpus, artrite reumatóide, Diabetes 1):
Imunodeficiência congênita:
ii. Imunossupressão (Ato de reduzir a atividade ou eficiência do sistema imunológico, induzido por terapia):
1) Não-imunossuprimido: ( )

2) Imunossuprimido: ( )	
Quimioterapia nos últimos 30d:	
Inibidor específico da Célula T (Ciclosporina, tacrolimo):	
Agente citotóxico (Azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato):	
Paciente em uso de corticosteroides (Prednisona, prednisolona, metoprednisolona) por mais do que 15 dias (Prednisona >40 mg/dia ou hidrocortisona > 160 mg/dia ou metilprednisolona >3 mg/dia, ou dexametasona > 6 mg/dia):	
Inibidores da rapamicina (mTORi, sirolimo, everolimo):	
Antiproliferativo (Micofenolato ou azatioprina):	
Anticorpos (Muromonab-CD3):	
Anticorpo (Imunoglobulina Anti-D):	
Outro. Qual?	
d. DISPOSITIVOS:	
i. CVC (Cateter Venoso Central):	
1) Não-tunelizado (Indicados em pacientes que apresentam necessidade de acesso vascular por um curto período, aproximadamente 21 a 30 dias, ou em pacientes que necessitam de hemodiálise de urgência, ou que já estão em hemodiálise e tiveram algum problema com o acesso definitivo):	
Duplo-lúmen:	
CVC de inserção periférica (PICC):	
Shilley:	
2) Tunelizado (Indicados em pacientes que necessitam de bom acesso vascular, por um período prolongado. Apresentam um cuff no terço médio do cateter, o qual fica no túnel subcutâneo ou são totalmente implantados, o que os protege da infecção. Vale ressaltar que esses dispositivos devem ser implantados em ambiente totalmente estéril, ou seja, no centro cirúrgico, com a ajuda de uma escópia e com o paciente sedado ou com anestesia geral):	
Permcath:	
Port-o-cath:	
Hickman:	
ii. Cateterismo Vesical:	
Uretral: ( )	Suprapúbica: ( )
Alívio (Forma intermitente): ( )	
Cateter uretral de Nélaton: ( )	
Tempo: _____ dias	

Demora (Longa permanência): ( )
Cateter vesical de Foley (Duas vias): ( )
Sonda de lavagem vesical de Owen (Três vias): ( )
Tempo: _____ dias
iii. Ventilação Mecânica:
1) Invasiva: ( )
a) Tubo endotraqueal:
Tubo endotraqueal orotraqueal: ( )
Tubo endotraqueal nasotraqueal: ( )
b) Cânula de traqueostomia: ( )
Tempo: _____ dias
2) Não invasiva: ( )
a) Sistemas de baixo fluxo:
Cânula nasal: ( )
Cateter nasal: ( )
Máscaras nasais ou faciais (CPAP, BiPAP, PAV, VAPS): ( )
Tempo: _____ dias
b) Sistemas de alto fluxo:
Cânula nasal de alto fluxo (CNAF): ( )
Máscara de Venturi: ( )
Tipo capacete ELMO: ( )
Tempo: _____ dias
iv. Dispositivos cirúrgicos:
1) Prévio (Anterior à internação):
Qual?
Data:

2) Atual (Na vigência do isolamento fúngico e/ ou da internação atual):	
Qual?	
Data:	
e. TRANSFUSÃO:	
Concentrado de hemácias filtradas. Data:	
Concentrado de leucócitos filtrados. Data:	
Concentrado de plaquetas. Data:	
f. TRANSPLANTE:	
i. TX (Transplante) de órgão sólido:	
Rim ( ). Data:	Fígado ( ). Data:
Coração ( ). Data:	Pulmão ( ). Data:
Pâncreas ( ). Data:	Outro ( ). Qual? E data.
ii. Transplante de Medula Óssea (TMO):	
Autólogo ( )	Alogênico ( )
Aparentado ( )	
g. HEMODIÁLISE:	
h. ANTIMICROBIANOS (Pelo menos 48h antes da detecção fúngica [isolamento fúngico]. Relatar nome do medicamento, dose, via de administração, frequência de administração, e período da prescrição [intervalo de tempo ou data]):	
i. Intervenção:	
Profilático: ( )	
Tratamento (Refere-se ao tratamento de infecção microbiana baseada em suspeita clínica, sem a necessidade de confirmação microbiológica): ( )	
ii. Tipo:	
1) Antibacterianos:	

2) Antifúngicos:	
3) Antivirais:	
i. OUTROS MEDICAMENTOS E CONDIÇÕES (Relatar nome do medicamento, dose, via de administração, frequência de administração, dose máxima [mg/Kg] e período da prescrição [intervalo de tempo ou data]):	
i. Corticoterapia (Últimos 60 dias):	
ii. Radioterapia:	
iii. Quimioterapia:	
iv. Nutrição parenteral total:	
j. INTERNAÇÕES PRÉVIAS (O termo “prévio” refere-se a antes do primeiro isolamento fúngico):	
UTI > 48h:	
Número de internações prévias (Tempo > 10 dias):	

#### 6. ACHADOS MICROBIOLÓGICOS:

##### a. ATUALMENTE (TEMPO PRESENTE):

Isolado de interesse:

Isolado de coinfeção em mesmo sítio profundo:

Material:

Data da detecção:

Nº do pedido:

b. MICRORGANISMO (S) PRÉ-ISOLAMENTO AO PATÓGENO DE INTERESSE (De acordo com um período situacional de enfrentamento a uma condição do paciente, por exemplo: um período de atendimento ambulatorial, emergencial ou internação do paciente):		
1. Isolado:		Isolado de coinfeção em mesmo sítio profundo:
Material:	Data da solicitação:	Nº do pedido:
2. Isolado:		Isolado de coinfeção em mesmo sítio profundo:
Material:	Data da solicitação:	Nº do pedido:
c. MICRORGANISMO (S) PÓS-ISOLAMENTO DO PATÓGENO DE INTERESSE (De acordo com um período situacional de enfrentamento a uma condição do paciente, por exemplo: um período de atendimento ambulatorial, emergencial ou internação do paciente):		
1. Isolado:		Isolado de coinfeção em mesmo sítio profundo:
Material:	Data da solicitação:	Nº do pedido:
2. Isolado:		Isolado de coinfeção em mesmo sítio profundo:
Material:	Data da solicitação:	Nº do pedido:

<b>7. FUNGEMIA: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA, TRATAMENTO E DESFECHO (Cultura de sangue positiva obtida de uma ou mais amostras de veia periférica com crescimento de <i>Trichosporon spp.</i>, temporalmente associada a sinais e sintomas clínicos de infecção [febre, calafrio ou hipotensão]):</b>	
a. TIPO DE FUNGEMIA:	
i. Comunitária (em paciente ambulatorial ou admitido em período igual ou inferior a 72 horas de internação): ( )	
ii. hospitalar (Cultura positiva após 72 horas de internação hospitalar, sem vigência de foco infeccioso prévio a internação; exceto reinternação hospitalar; 30 dias após cirurgia ou um ano após inserção de prótese, segundo critérios descritos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças [CDC]): ( )	
iii. breakthrough (Ocorrência de fungemia em paciente recebendo ao menos três dias de terapia antifúngica sistêmica para qualquer finalidade): ( )	
b. TIPO DE EPISÓDIO:	
Primeiro episódio: ( )	Segundo episódio: ( )

c. RELAÇÃO COM SÍTIO INFECTADO:	
i. Primária sanguínea (Hemocultura positiva sem relação com outras topografias infecciosas): ( )	
ii. Relacionada ao cateter (Por exemplo: Sangue do PICC, sangue do cateter venoso central e ponta do cateter pelo método Maki, Sendo estes relacionados ao mesmo isolado de hemocultura positiva): ( )	
iii. Relacionada ao sangue do cateter (Por exemplo: Sangue do PICC, sangue do cateter venoso central ou outro cateter, sendo estes não relacionados ao mesmo isolado de hemocultura positiva): ( )	
iv. Relacionada ao sítio cirúrgico (Hemocultura positiva na vigência de infecções de sítio cirúrgico): ( )	
v. Relacionada a infecção de trato urinário (Hemocultura positiva para mesma espécie de levedura isolada em urocultura prévia): ( )	
vi. Outro:	
d. SINAIS/SINTOMAS (Durante o 1º isolamento fúngico em vigência da admissão ou no percurso da internação):	
i. Geral:	
Febre (Indicar):	Instabilidade térmica:
Calafrios:	
Hipotensão (Pressão sistólica $\leq 90$ mmHg) (indicar):	Frequência cardíaca (F.C.):
Pressão Arterial Média (P.A.M) (Sistólica + 2x diastólica / 3):	Alterações da circulação periférica:
Nível de saturação de oxigênio (SAT. O <sup>2</sup> ):	
Hipoglicemia (Pelo menos três averiguações) - Dx:	
Manifestações cutâneas (Petéquias, exantema, rash, etc):	
Convulsões (Nº de episódios):	
Alteração do nível de consciência:	
Outro:	
ii. Outro:	

---

<b>8. TRATAMENTO:</b>
a. MEDICAMENTOSO:
i. Antifúngico (Relatar nome do medicamento, dose, via de administração, frequência de administração, e período da prescrição [intervalo de tempo ou data]):
b. NÃO-MEDICAMENTOSO:
i. Houve remoção do cateter, proveniente de isolamento de microrganismo?
Sim ( ) ou Não ( ). Se sim, prosseguir. E se não, ignorar próximos questionários do item.
Qual tipo?
Data:

## Anexo 2. Comprovante de publicação - 1º artigo



**Biofouling**

The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: [www.tandfonline.com/journals/gbif20](http://www.tandfonline.com/journals/gbif20)



## **Inhibition of calcineurin as a strategy for biofilm control: *Trichosporon* spp. as a case study**

**Bruno Nascimento da Silva, Ana Raquel Colares de Andrade, Francisco Eilton Sousa Lopes, Ana Luiza Ribeiro Aguiar, Fernando Victor Monteiro Portela, Maria Laina Silva, Brendda Miranda Vasconcelos, José Júlio Costa Sidrim, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro**

To cite this article: Bruno Nascimento da Silva, Ana Raquel Colares de Andrade, Francisco Eilton Sousa Lopes, Ana Luiza Ribeiro Aguiar, Fernando Victor Monteiro Portela, Maria Laina Silva, Brendda Miranda Vasconcelos, José Júlio Costa Sidrim, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro (30 Apr 2025): Inhibition of calcineurin as a strategy for biofilm control: *Trichosporon* spp. as a case study, *Biofouling*, DOI: [10.1080/08927014.2025.2492712](https://doi.org/10.1080/08927014.2025.2492712)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08927014.2025.2492712>



© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



View supplementary material [↗](#)



Published online: 30 Apr 2025.



Submit your article to this journal [↗](#)