UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**UNIVERSIDAD
DE LA FRONTERA**

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

NÚCLEO CIENTÍFICO TECNOLÓGICO EN BIORECURSOS - BIOREN-UFRO

**Perfil fenotípico e genotípico de *Fusarium* spp. provenientes de
episódios clínicos de fusarioses no Estado de São Paulo**

Mario Henrique Paziani

Ribeirão Preto – SP

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
NÚCLEO CIENTÍFICO TECNOLÓGICO EN BIORECURSOS - BIOREN-UFRO

**Perfil fenotípico e genotípico de *Fusarium* spp. provenientes
de episódios clínicos de fusarioses no Estado de São Paulo**

Tese de Doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia da
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto
para Áreas de Concentração:
Bioagentes e Biotecnologia Aplicados
à Farmácia / Biologia Molecular y
Celular.

Orientado: Mario Henrique Paziani

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia
Regina von Zeska Kress.

Supervisor: Prof.^o Dr.^o Cledir Santos.

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 27/07/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Paziani, Mario Henrique

Perfil fenotípico e genotípico de *Fusarium* spp. provenientes de episódios clínicos de fusariose no Estado de São Paulo. Ribeirão Preto, 2021.

71 p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Áreas de concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia y Biología Molecular y Celular Universidad de La Frontera (UFRO - Chile).

Orientadores: Kress, Marcia Regina von Zeska Kress
Cledir Santos

1. *Fusarium*. 2. Fusariose. 3. Antifúngicos. 4. MALDI-TOF MS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Mario Henrique Paziani

Título do trabalho: Perfil fenotípico e genotípico de *Fusarium* spp. provenientes de episódios clínicos de fusarioses no Estado de São Paulo

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências y al Programa de Posgrado en Biología Celular y Molecular de la Universidad de La Frontera.

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Regina von Zeska Kress

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus queridos pais, *Dorival Roque Paziani* e *Olinda Rodrigues dos Santos Paziani*, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS NO BRASIL

A Prof.^a Dr.^a Marcia Regina von Zeska Kress, pela orientação na Universidade de São Paulo;

Aos meus familiares, Daniela Rodrigues Paziani, James Paziani de Oliveira Júnior, Karina Rodrigues Paziani, Davi Paziani, Diogo Paziani e Ivalda Paziani.

A minha amada avó paterna, Brigida Violin Paziani (*In memoriam*);

A minha mentora científica, Ludmilla Tonani Carvalho e toda a equipe do laboratório LEGPFF/FCFRP-USP (Laboratório de Expressão Gênica e Proteômica de Fungos Filamentosos);

Ao Prof.^o Dr. Gustavo Henrique Goldman do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP pela utilização de equipamentos e colaborações em pesquisas.

Ao Professor Dr. Gilberto Úbida Leite Braga do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–SP (FCFRP-USP) e sua equipe científica;

A Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia da Costa Darini do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–SP (FCFRP-USP) e sua equipe científica;

Aos funcionários e técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–SP (FCFRP-USP);

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

AGRADECIMIENTOS EN CHILE

Al Prof.º Dr.º Cledir Santos por toda su cordialidad en mi recepción en este país y por la plena orientación científica;

A la Universidad de La Frontera – UFRO (Temuco, Chile) por haber reconocido nuestros trabajos científicos y aceptado mi pasantilla de Doctorado;

Al coordinador del Programa de Posgrado en Biología Molecular y Celular de la UFRO, Prof.º Dr.º Luis Salazar;

A la directora del BIOREN (Scientific and Technological Bio-resource Nucleus) de la UFRO, Prof.ª Dr.ª Maria de la Luz Mora G.;

A la técnica de la Colección Chilena de Cultivos Tipo-CCCT/UFRO, Isabel Filomena;

A los técnicos de operación del equipo (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) MALDI-TOF MS;

A los alumnos de posgrado y compañeros que yo tuve el gusto de haber conocido en la UFRO;

A la Familia Fuentealba Cabezas: Guillermina, Hector y Jonathan;

Agradezco a Chile por todo que yo viví, aprendí y evolucioné en este precioso país.

“Puedes cortar todas las flores, pero no puedes detener la primavera”

(Pablo Neruda)

RESUMO

PAZIANI, M. H. **Perfil fenotípico e genotípico de *Fusarium* spp. provenientes de episódios clínicos de fusarioses no Estado de São Paulo.** 2021. 71f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O gênero *Fusarium* apresenta espécies de fungos filamentosos do filo Ascomycota e são majoritariamente isolados em regiões tropicais e subtropicais de uma grande variedade de substratos, como solo e plantas. Em humanos, a fusariose subcutânea aumentou em níveis alarmantes e pode progredir à infecção invasiva, devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos. Os potenciais patógenos humanos do gênero *Fusarium* são membros dos complexos de espécies FOSC, FSSC, FFSC e FDSC. O objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar 108 isolados clínicos de *Fusarium* spp. provenientes de infecções em pacientes do Estado de São Paulo, Brasil. Estes foram identificados pelo método molecular de sequenciamento das regiões ITS do rDNA e do gene EF1 α , e pelo método fenotípico de MALDI-TOF MS. Os isolados clínicos foram avaliados quanto a capacidade de formar biofilme, susceptibilidade aos antifúngicos e à terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) e virulência no modelo alternativo *G. mellonella*. Entre os isolados clínicos do FSSC estão *F. keratoplasticum* (n=58; 59,7%), *F. solani* (n=28; 28,8%), *F. falciforme* (n=9; 9,2%) e *F. petroliphilum* (n=2; 2,0%). No FOSC, todos os isolados clínicos (n=9; 100%) são *F. oxysporum*, enquanto que para FFSC (n=1; 100%) e FDSC (n=1; 100%), os isolados clínicos são *F. proliferatum* e *F. delphinoides*, respectivamente. MALDI-TOF MS identificou e agrupou a maioria dos isolados clínicos nos complexos de espécies de *Fusarium*. Os isolados clínicos de FSSC apresentaram maior capacidade de produção de biofilme comparando com FOSC. A maior parte dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. apresentam altas CIMs *in vitro* de itraconazol. Além disso, a TFDA com fotossensibilizadores fenotiazínicos foi eficaz *in vitro* e *in vivo* contra todas as espécies de *Fusarium*. FSSC apresenta maior virulência em *G. mellonella*, em comparação com os outros complexos de espécie. Nossos estudos expandem a compreensão do perfil fenotípico e genotípico de *Fusarium* spp. no Estado de São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: *Fusarium* sp., fusariose, identificação molecular, MALDI-TOF MS, terapia fotodinâmica antimicrobiana, virulência, *Galleria mellonella*, biofilme.

ABSTRACT

PAZIANI, M. H. **Phenotypic and genotypic profile of *Fusarium* spp. from clinical episodes of fusariosis in the State of São Paulo.** 2021. 71f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Fusarium genus is composed of filamentous fungi of the phylum Ascomycota and are mostly isolated in tropical regions, in a wide variety of substrates, such as soil and plants. In humans, subcutaneous fusariosis has increased to alarming levels and can progress to invasive infection, due to the increasing number of immunocompromised patients. The potential human pathogens among *Fusarium* spp. are members of FOSC, FSSC, FFSC, and FDSC. The present study aimed to identify and characterize 108 clinical isolates of *Fusarium* spp. from infections in patients from the State of São Paulo, Brazil. The clinical isolates were identified by sequencing the ITS regions of the rDNA and the EF1 α gene and with the phenotypic method MALDI-TOF MS. The clinical isolates were evaluated for their ability to form a biofilm, *in vitro* antifungal susceptibility to commercial antifungal drugs, *in vitro* and *in vivo* susceptibility to antimicrobial photodynamic therapy (APDT), and virulence analyzes in the alternative model *Galleria mellonella*. Among the clinical isolates of the FSSC are *F. keratoplasticum* (n=58; 59.7%), *F. solani* (n=28; 28.8%), *F. falciforme* (n=9; 9.2%), and *F. petroliphilum* (n=2; 2.0%). In FOSC, all clinical isolates (n=9; 100%) are *F. oxysporum*, while for FFSC (n=1; 100%) and FDSC (n=1; 100%), clinical isolates are *F. proliferatum* and *F. delphinoides*, respectively. MALDI-TOF MS identified and grouped the *Fusarium* clinical isolates in the species complexes. The clinical isolates of FSSC showed greater biofilm production capacity compared to FOSC. Most of the *Fusarium* spp. have shown high MIC of itraconazole and FSSC has a higher virulence in *G. mellonella*, compared to other species complexes. In addition, TFDA with phenothiazine photosensitizers has been effective *in vitro* and *in vivo* against all *Fusarium* species. Our studies expand the understanding of the phenotypic and genotypic profile of *Fusarium* spp. in the State of São Paulo, Brazil.

Keywords: *Fusarium* sp., fusariosis, molecular identification, MALDI-TOF MS, antimicrobial photodynamic therapy, virulence, biofilm.

RESUMEN

PAZIANI, M. H. **Perfil fenotípico y genotípico de *Fusarium* spp. de episodios clínicos de fusariosis en el Estado de São Paulo.** 2021. 71f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Fusarium son hongos filamentosos del filo Ascomycota y se aíslan mayoritariamente en regiones tropicales, en una amplia variedad de sustratos, tales como: suelo y restos vegetales. En humanos, la fusariosis subcutánea ha aumentado a niveles alarmantes y puede progresar a una infección invasiva, debido al número creciente de pacientes inmunodeprimidos. Los patógenos humanos potenciales entre *Fusarium* spp. son miembros de FOSC, FSSC, FFSC y FDSC. El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar 108 aislados clínicos de *Fusarium* spp. de infecciones en pacientes de la provincia de São Paulo, Brasil. Los métodos adoptados fueron moleculares, mediante la secuenciación de las regiones ITS del ADNr y del gen EF1 α . Además, evaluamos el potencial para identificar dichos aislados clínicos mediante MALDI-TOF MS. Para caracterizar los aislados clínicos de *Fusarium* spp., la biopelícula se dió con cristal violeta (biomasa) y safranina (matriz), susceptibilidad antifúngica *in vitro*, terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) y las análisis de virulencia en el modelo alternativo *Galleria mellonella*. Entre los aislados clínicos de la FSSC se encuentran *F. keratoplasticum* (n=58; 59,7%), *F. solani* (n=28; 28,8%), *F. falciforme* (n=9; 9,2%) y *F. petroliphilum* (n=2; 2,0%). En FOSC, todos los aislados clínicos (n=9; 100%) son *F. oxysporum*, mientras que para FFSC (n=1; 100%) y FDSC (n=1; 100%), los aislados clínicos son *F. proliferatum* y *F. delphinoides*, respectivamente. El MALDI-TOF MS identificó y agrupó la mayoría de los aislados clínicos de *Fusarium*, pero a nivel de complejo de especies. Los aislados clínicos de FSSC mostraron una mayor capacidad de producción de biopelículas en comparación con FOSC. La mayoría de las especies de *Fusarium* son resistentes al itraconazol y FSSC tiene un perfil de virulencia más alto en comparación con otros complejos de especies. Además, TFDA con fotosensibilizadores fenotiazínicos ha sido eficaz *in vivo* contra todos los aislados clínicos. Nuestros estudios amplían la comprensión del perfil fenotípico y genotípico de *Fusarium* spp. en el estado de Sao Paulo, Brasil.

Palabras clave: *Fusarium* sp., fusariosis, identificación molecular, MALDI-TOF MS, terapia fotodinámica antimicrobiana, virulencia, biopelícula.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Reprodução assexual de *Fusarium* spp. Adaptado de Barnett e Hunter, 1998. 2
- Figura 2: Diagrama de Jablonski. Adaptado de Dai et al., 2012..... 10
- Figura 3: Anatomia de uma larva de *Galleria mellonella*, adaptada de Dorieux e colaboradores (2021). 11
- Figura 4: Publicações entre o ano de 2010 e 2020 que mencionam *G. mellonella* no site Pubmed. 12
- Figura 5: Áreas de coleta no Estado de São Paulo, Brasil, (a) Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP), (b) Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - SAC / FCFRP da Universidade de São Paulo - USP) e (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - HC / FMRP da Universidade de São Paulo - USP), (c) São Paulo (Instituto Adolfo Lutz - IAL). 15
- Figura 6: Colônia gigante dos isolados clínicos de *Fusarium* sp. Colônias gigante (verso e frente) dos isolados clínicos em meio de cultura PDA a 28°C por 3 - 5 dias. (A) *Fusarium* spp. (B) *F. oxysporum* Specie Complex (FOSC). 28
- Figura 7: As características micromorfológicas de *Fusarium* sp. (A e C) Conidióforos do complexo de espécies *F. solani*, (B e D) conidióforos do complexo de espécies *F. oxysporum* e Meio PDA a 28°C por 2 dias. Corante lactofenol azul de algodão em microscopia óptica (400x, Observer Z 1 - Carl Zeiss Jena, Alemanha). As setas indicam septos, asteriscos indicam macroconídios. Barra de escala: 10 µm... 29
- Figura 8: Resumo gráfico da identificação molecular (ITS e EF-1 α) dos isolados clínicos de complexos de espécies *Fusarium* (n = 108). A. Identificação a partir de sequenciamento das regiões ITS; B. Identificação a partir de sequenciamento do sequenciamento do gene EF-1 α . M.H. Paziani e colaboradores (2019). 30
- Figura 9: Dendrograma ITS e EF-1 α concatenado sobre 108 *Fusarium* spp. Porcentagem do bootstrap (nós). Barra de escala indica substituições de nucleotídeos por local. Outgroup, *Cylindrocarpon cylindroides* estirpe CBS 324.61. M.H. Paziani e colaboradores (2019). 31
- Figura 10: Dendrograma fenotípico baseado no espectro de MALDI-TOF MS, obtido na faixa de 2000 a 20000, para *Fusarium* Species Complex. Dendrograma de similaridade espectral foi obtido pelo algoritmo de aglomeração com o software MALDI

Biotyper Compass 4.1. C a G - perfis espectrais de massa de isolados clínicos de FSSC e linhagem de controle. M.H. Paziani e colaboradores (2020). 34

Figura 11: Espectros de massas MALDI-TOF para as espécies dos complexos de *Fusarium* sp. A, espectro de deformação do FSSC (*F. keratoplasticum* - ATCC 36031); B, espectro de deformação do FOSSC (*F. oxysporum* - ATCC 48112); Espectros de isolados clínicos de C, D, E, F e G, FSSC; Espectros de isolados clínicos de H, I e J, FOSSC; K, espectro de isolados clínicos FFSC; e L, espectro clínico isolado de FDSC. À direita do painel é indicado o ID de cada cepa e / ou isolado clínico. Os espectros são apresentados na faixa de 2000 a 10000 Da, onde são observados os principais picos de massa. M.H. Paziani e colaboradores (2019). 36

Figura 12: Correlação de Pearson entre os valores de absorvância da biomassa e matriz do biofilme dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. Assinalado em vermelho são isolados considerados altos formadores de biofilme ($P < 0,05$). Fonte: autoria própria.....38

Figura 13: Avaliação *in vitro* da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) contra os isolados clínicos de *Fusarium* sp. Controle, conídios em PBS (pH 7,4); *Dark*, conídios com ou sem FS no escuro absoluto; *Light*, conídios expostos a fonte de luz de 635 nm a 15 J cm⁻²..... 42

Figura 14: Avaliação da toxicidade *in vivo* dos fotosensibilizadores fenotiazínicos. Modelo *in vivo* *Galleria mellonella*. MB, azul de metileno; NMBN, *new methylene blue* N; S137, pentacíclico derivado do MB; PBS, fósforo *buffer* salina; L-, escuro; L+, 15 J cm⁻²; OS, fotosensibilizador; 1 ×, MB (750 µM), NMBN e S137 (100 µM); 1 ×, 750 µM (MB) e 100 µM (NMBN e S137); 2 ×, 1500 µM (MB) e 200 µM (NMBN e S137); 3 ×, 2250 µM (MB) e 300 µM (NMBN e S137). M.H. Paziani et al. (2020). 43

Figura 15: Avaliação dos perfis de virulência *in vivo*, em relação a formação de biofilme. Alto formador de biofilme (+++), (-) baixo formador de biofilme. ATCC FSSC = cepa INCQS 40099 (ATCC® 36031). PBS: controle negativo para infecção artificial. 45

Figura 16: *G. mellonella* no sexto instar, após 24 horas de infecção artificial. Fotos tiradas após rápido congelamento a -20°C. A: larva controle negativo, submetida à inoculação de PBS 1X (pH 7,4) (vista dorsal e ventral); B: larva submetida à inoculação de 5 µl ou 1x10⁶ conídios/mL em PBS 1X (pH 7,4) (vista dorsal e ventral). B*: lesão cutânea causada por fusariose sistêmica. 46

Figura 17: Virulência dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. em larvas de *G. mellonella* em relação ao sítio anatômico de coleta. 47

Figura 18: Avaliação da TFDA em *Galleria mellonella* infectada com *F. keratoplasticum*. MB, azul de metileno; NMBN, *new metilene blue* N; S137, pentacíclico B derivativo; PBS, fosfato *buffer* salina; L-, escuro; L +, 15Jcm – 2; Fk, *F.keratoplasticum*; 1 ×, MB (750µM), NMBN e S137 (100µM); 1 ×, 750 µM (MB) e 100 µM (NMBN e S137); 2 ×, 1500 µM (MB) e 200 µM (NMBN e S137), M.H. Paziani et al. (2019)..... 48

Figura 19: *Fungal burden* da hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* após TFDA. MB, azul de metileno; NMBN, *new metilene blue* N; S137; PBS, fosfato *buffer* salina; L-, escuro; L +, 15Jcm – 2. UFC – unidade formadora de colônia. 49

Figura 20: Características específicas das células de resposta imune de *G. mellonella*. A e B: Plasmatócito (pl); C e D: Plasmatócito alongado (pl) ou lamelócito (lm); E e F: granulócito (gr); G e H: Esferulócito (sp); I e J: Oenocitóide (oe). Corado com panótico rápido Laborclin® e analisado por microscopia óptica (400x, Observer Z 1 - Carl Zeiss Jena, Alemanha), Bar = 5µm..... 50

Figura 21: Contagem total de hemócitos da hemolinfa de larvas de *G. mellonella*. MB, *metilene blue*; NMBN, *new metilene blue* N; S137, pentacíclico B derivativo; PBS, fosfato *buffer* salina; L-, escuro; L +, 15 J cm – 2; *Naïve*, larva não manipulada. M.H. Paziani et al. (2020). 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
×	Vezes
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
A	Adenina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C	Citosina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CTH	Contagem total de hemócitos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídios
ECV	<i>Epidemiological Cutoff Value</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EF1α	<i>Elongation Factor 1 alpha</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fw	<i>Forward</i>
FIESC	Complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum equiseti</i>
FDSC	Complexo de espécies <i>Fusarium dimerum</i>
FFSC	Complexo de espécies <i>Fusarium fujukuroi</i>
FOSC	Complexo de espécies <i>Fusarium solani</i>

FSSC	Complexo de espécies <i>Fusarium oxysporum</i>
FS	Fotossensibilizador
G	Guanina
h	Hora
IPS	<i>Insect phosphate saline</i>
J cm ⁻²	Jaules por centímetros quadrados
Kb	Quilo bases
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
LMC	Laboratório de Micologia Clínica
m	Metro
M	Molar
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
MB	Azul de Metileno
m/v	Relação massa-volume
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
mg	Miligrama
MG	Média Geométrica
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mV	Milivolt
MOPS	Ácido pro-panesulfônico 0,165 M 3-(N-morfolino)
n	Número amostral

NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NMBN	Novo Azul de metileno
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PBS	Tampão Salina Fosfato
Pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com tampão fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PDA	Ágar Batata Dextrose
pH	Potencial de hidrogênio iônico
p/v	Razão peso-volume
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Rv	<i>Reverse</i>
S137	Derivado pentacíclico do MB
T	Timina
TBO	Azul de Toluidina O
TFDA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
UFC	Unidades formadoras de colônias

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Relação de isolados identificados por biologia molecular e sítio anatômico de coleta. Fonte: autoria propria..... 32

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. aos antifúngicos. MG CIM, média geométrica da concentração inibitória mínima. (*) valores absolutos, dado pelo n =1. Fonte: autoria própria..... 40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - O gênero <i>Fusarium</i>	1
1.2 - O tratamento da fusariose e os antifúngicos	6
1.3 - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	8
1.4 - Modelo alternativo para análise de virulência <i>Galleria mellonella</i>	10
2 – Objetivos.....	13
2.1 - Objetivos gerais.....	13
2.2 - Objetivos específicos.....	13
3 – Material e métodos	14
3.1 – Isolados clínicos e condições de cultura.....	14
3.2 – Análise morfológica dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.....	15
3.2.1 - Análise macromorfológica	15
3.2.2 - Análise micromorfológica	16
3.3 - Extração do DNA genômico de <i>Fusarium</i> spp.	16
3.4 – Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.....	17
3.5 – Identificação dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp. por MALDI-TOF MS.....	18
3.6 – Ensaio de formação de biofilme dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.....	19
3.7 – Teste <i>in vitro</i> da susceptibilidade dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp. aos antifúngicos	20
3.8 – Teste <i>in vitro</i> da susceptibilidade dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp. a terapia fotodinâmica antimicrobiana	21
3.10 – Estudo da virulência dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> em modelo alternativo <i>Galleria mellonella</i>	23
3.11 – Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana no modelo experimental <i>Galleria mellonella</i> infectada com linhagens controle de <i>Fusarium</i> spp.....	25
3.12 - Avaliação da toxicidade dos fotossensibilizadores fenotiazínicos no modelo experimental <i>Galleria mellonella</i>	26
3.13 - Avaliação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em modelo alternativo <i>Galleria mellonella</i>	26
3.14 – Fungal burden pós terapia fotodinâmica antimicrobiana em <i>Galleria mellonella</i>	27
3.15 - Contagem total de hemócitos no modelo experimental <i>Galleria mellonella</i> quanto a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.	27
3.16 - Análise estatística.....	28
4. Resultados	28

4.1 Caracterização morfológica dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.....	28
4.1.1 - Caracterização macromorfológica dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	28
4.1.2 - Caracterização micromorfológica dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.	29
4.2 Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.	30
4.2.1 – Relação sítios anatômicos de coleta e espécie do isolado clínico de <i>Fusarium</i> spp. ..	32
4.3 – Identificação fenotípica dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp. por MALDI-TOF MS....	33
4.4 – Formação de biofilme dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.....	37
4.5 – Susceptibilidade <i>in vitro</i> dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp. aos antifúngicos	39
4.6 – Avaliação <i>in vitro</i> da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) contra os isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.	41
4.7 - Avaliação da toxicidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com fotossensibilizadores fenotiazínicos em <i>G. mellonella</i>	42
4.8 – Ensaio de virulência <i>in vivo</i> dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> sp. em <i>Galleria mellonella</i> 44	
4.8.1 - Virulência dos isolados clínicos em relação a capacidade de formação de biofilme... 44	
5.8.2 –Virulência dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp. em relação aos diferentes sítios anatômicos	46
5.8.3 - Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em <i>G. mellonella</i> infectada com isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.	47
5.8.4 – Validação da TFDA <i>in vivo</i> por <i>fungus burden</i>	48
5.8.5 – A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e os hemócitos circulantes na hemolinfa das larvas de <i>G. mellonella</i>	49
6. Discussão	51
7. Conclusão	61
Referências bibliográficas	63
ANEXO I.....	72
ANEXO II.....	77
ANEXO III.....	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 – O gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* (ordem *Hypocreales*) está classificado no filo Ascomycota do reino Fungi e é composto por espécies de fungos filamentosos que são isoladas de uma ampla variedade de substratos, como solo e restos de plantas. É um gênero cosmopolita, porém a sua principal ocorrência está nas regiões tropicais. *Fusarium* spp. são em sua maioria fitopatógeno para diversos agroecossistemas (NELSON; DIGNANI; ANAÏSSIE, 1994), mas também patógeno oportunista em humanos que causam infecções nos olhos, pele, unhas e disseminadas. O primeiro relato de fusariose, denominação dada à infecção causada por espécies de *Fusarium*, foi devido a uma infecção ocular em 1958 (MIKAMI; STEMMERMANN, 1958) e logo em seguida outras modalidades de infecção foram relatadas (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016).

Espécies desse gênero são relatadas por desenvolverem reprodução sexual e assexual (figura 1). No desenvolvimento vegetativo, apresentam micélios ramificados que são compostos de hifas hialinas e septadas com células anucleadas ou multinucleadas. Na reprodução assexual, o conidióforo surge da diferenciação celular a partir das hifas vegetativas. Os conidióforos são compostos por hifas curtas com produção de células germinativas em forma de fuso (fiálides) que formam os microconídios e macroconídios (figura 1) (ALSOHAILI; BANI-HASAN, 2018). Os macroconídios são longos, em forma de foice, multi-septados (3-5 septos), afilados nas pontas e mais largo no meio. Eles medem em torno de 15-50 µm de comprimento e 3-5 µm de largura. Os microconídios são menores, em relação aos macroconídios, e medem em torno de 6-15 µm de comprimento e 2-6 µm de largura. Tanto os macroconídios quanto os microconídios são produzidos em grande número e são facilmente disseminados pelo vento ou água e, uma vez em solo favorável para seu desenvolvimento, os conídios germinam e infectam os hospedeiros (ALSOHAILI; BANI-HASAN, 2018).

Figura 1: Reprodução assexual de *Fusarium* spp. Fonte: Adaptado de Barnett e Hunter, 1998.

A alta capacidade das espécies de *Fusarium* permanecerem viáveis por um longo período no solo está relacionada à sua capacidade de produção de clamidoconídios (AHEARN; DOYLE STULTING, 2014).

Este gênero fúngico abriga mais de 300 espécies que são agregadas em 22 complexos de espécie (*species complex*). No gênero *Fusarium*, um complexo de espécies é definido como um agrupamento de entidades intimamente relacionadas exibindo mesmos hospedeiros e semelhantes características fisiológicas e moleculares (DE HOOG et al., 2017). Os isolados clínicos causadores de fusariose são frequentemente de três complexos de espécie, o complexo de espécies *F. solani* (FSSC), o complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC) e o complexo de espécies *F. fujikuroi* (FFSC) (LESLIE; SUMMERELL, 2007; WALTHER et al., 2017). Os complexos de espécies *F. dimerum* (FDSC), *F. incarnatum-equiseti* (FIESC), *F. chlamydosporum* (FCSC) e *F. sporotrichioides* que pertence ao complexo de espécies *F. sambucinum*

(FSAMSC) são raros causadores de infecção em humanos (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016; O'DONNELL et al., 2015; VAN DIEPENINGEN et al., 2015).

No FSSC, existem seis principais espécies envolvidas em casos clínicos e uma linhagem sem binômio, chamada FSSC6. As espécies *F. falciforme*, *F. petroliphilum* e *F. keratoplasticum* foram as espécies dominantes em casos de fusarioses em humanos no México, na Ásia e na América do Norte (HASSAN et al., 2016). No gênero *Fusarium*, *F. keratoplasticum* tem sido relatado como o principal agente etiológica da micose subcutânea do tipo micetoma, da fusariose disseminada (AL-HATMI et al., 2018a) e da fusariose em pacientes com doenças hematológicas (CHIEWCHANVIT et al., 2017; GARCÍA-RUIZ et al., 2015). Além disso, *F. keratoplasticum* é um importante agente etiológico veterinário causador de doença disseminada em diversos tipos de mamíferos (O'DONNELL et al., 2015). As espécies do FSSC estão emergindo como as mais virulentas e associadas a infecções de córnea. Aproximadamente 80% das infecções humanas são causadas por membros do FSSC, seguida por uma parcela menor do FOSC (AL-HATMI et al., 2016; SHORT; O'DONNELL; GEISER, 2014).

O complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC) contém três espécies envolvidas na fusariose, embora ainda não tenham sido formalmente reportadas como espécies taxonômicas distintas (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016). Do ponto de vista taxonômico tradicional, as espécies do FOSC podem ser diferenciadas entre si e com base na fitopatogenicidade como *formae speciales*, mas estudos demonstraram que esta pode ser uma abordagem pouco confiável. Além disso, a denominação *forma speciales* foi apenas para o FOSC e pelo menos 26 tipos de sequências identificadas dentro do referido complexo de espécies estão também envolvidas em infecções em humanos (AL-HATMI et al., 2016; O'DONNELL et al., 2008).

Embora raras, outras espécies de *Fusarium* estão emergindo como possíveis patógenos oportunistas, por exemplo *F. acutatum*, *F. ananatum*, *F. anthophilum*, *F. andiyazi*, *F. fujikuroi* ss, *F. globosum*, *F. guttiforme*, *F. musae*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. ramigenum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. temperatureum* e *F. thapsinum* que pertencem ao complexo de espécies *F. fujikuroi* (FFSC). *F. incarnatum* e *F. equiseti* que pertencem ao complexo de espécies *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) e *F.*

dimerum, *F. delphiniodes* e *F. penzigii* que são abrigados pelo complexo de espécies *F. dimerum* (FDSC) (AL-HATMI et al., 2016, 2018b).

A ocorrência da fusariose está relacionada principalmente às micoses superficiais. No entanto, com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, o número de fusariose subcutânea aumentou em níveis alarmantes (GAVIRIA-RIVERA et al., 2018) tornando a fusariose, após a aspergilose, a segunda infecção por fungos filamentosos mais comum em pacientes com neoplasias hematológicas (DELIA et al., 2016). Em humanos, os prognósticos de fusarioses disseminadas são ruins e as taxas de mortalidades são altas, próximas a 75% (AL-MAQTOOFI; THORNTON, 2016; WANG et al., 2020).

Espécies de *Fusarium* foram relatadas com alta performance na formação de biofilme, mecanismo que auxilia o microrganismo a colonizar o hospedeiro e resistir aos tratamentos antifúngicos (AL-MAQTOOFI; THORNTON, 2016; CÓRDOVA-ALCÁNTARA et al., 2019). O biofilme é definido como uma comunidade altamente estruturada, em que os microrganismos estão associados entre si e incorporados em uma matriz extracelular, produzida pela própria comunidade microbiana (CALVILLO-MEDINA et al., 2019). A capacidade dos microrganismos de aderirem às células, tecidos ou superfícies inertes é um pré-requisito para o início do processo de colonização e subsequente infecção. Assim, a capacidade de adesão que precede a formação do biofilme, desempenha um papel fundamental na virulência do patógeno (SAV et al., 2018). Portanto, sugere-se que o biofilme facilite a passagem do patógeno para os tecidos mais profundos do hospedeiro (BORGHI; BORGIO; MORACE, 2016).

Como fonte de contaminação, é importante relatar que espécies de *Fusarium* estão presentes em sistemas hidráulicos, incluindo os hospitais, devido à sua alta capacidade de adesão e produção de biofilme. Além disso, entre os anos de 2005 e 2007, mais de 300 casos de infecções na córnea foram relatados devido à presença de biofilme de *Fusarium* sp. em lentes de contato (MUHAMMED et al., 2013). Assim, faz-se necessário a correta e rápida identificação dos referidos patógenos nesses ambientes. Entretanto, o método clássico de identificação de fungos apresenta restrições, quanto a identificação de espécies, subespécies e espécies crípticas que estão dentro dos complexos de espécies de *Fusarium* (BOUTIGNY et al., 2019).

Os métodos moleculares são importantes para a taxonomia fúngica, por sua identificação precisa, associado a genômica e diversas funções biológicas (HIBBETT et al., 2016). Algumas outras técnicas são baseadas em sistemas de ionização e detecção para a identificação rápida de microrganismos. Atualmente, um dos métodos mais amplamente estudados para a análise de biomoléculas é a *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) (GOULART; RESENDE, 2013). Essa metodologia é importante para a identificação de patógenos e para relacioná-los aos principais fatores de virulência, com base em perfis proteicos e fenotípicos de diferentes cepas para a mesma espécie (HIBBETT et al., 2016). Além disso, MALDI-TOF MS é listado pela comunidade científica como apropriado para identificação de fungos (RODRIGUEZ et al., 2019; WICKES; WIEDERHOLD, 2018), apresentando baixo custo do preparo das amostras e rapidez na obtenção de resultados (PACKEU et al., 2013; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Entretanto, o método MALDI-TOF MS, para identificação de espécies fúngica, ainda apresenta um limitado número de informações nos bancos de dados espectrais disponíveis para a consulta, implicando em falhas na correta identificação (PACKEU et al., 2013; REEVE; STEWART; RYAN, 2019).

O tratamento das infecções por *Fusarium* sp. continua sendo um grande desafio devido ao número limitado de drogas antifúngicas e ao surgimento de cepas multidroga resistentes (TAJ-ALDEEN et al., 2019). Os tratamentos antifúngicos convencionais atingem apenas 15% da reversão clínica das infecções, entre os casos relatados (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016).

O FSSC é responsável por cerca de 60% da fusariose e juntamente ao FFSC, formam o conjunto de complexos de espécies mais resistentes à terapia antifúngica convencional, principalmente à terapia com azóis (TAJ-ALDEEN et al., 2019) que inclui fluconazol, itraconazol e voriconazol. Esses medicamentos agem inibindo a via de síntese do ergosterol que é uma molécula estrutural essencial da membrana celular dos fungos (CHOWDHARY et al., 2013).

Nos casos de micoses, as opções de tratamentos disponíveis são de uso limitado devido aos fortes efeitos colaterais, interações medicamentosas, contraindicações e alta toxicidade (BHATIA et al., 2019). O aumento do uso de drogas antifúngicas, geralmente por um período maior ou de maneira

descontrolada, leva a emergência de cepas com resistência intrínseca (WIEDERHOLD, 2017).

1.2 – O tratamento da fusariose e os antifúngicos

O tratamento de micoses superficiais causadas por espécies de *Fusarium* inclui voriconazol, itraconazol, terbinafina, além do ciclopirox olamina que é utilizado nos casos de onicomicose (AL-HATMI et al., 2018). Os casos de ceratite são tratados com voriconazol e colírios de anfotericina B (TUPAKI-SREEPURNA et al., 2017). Os micetomas, micose subcutânea causada por espécies de *Fusarium*, são tratados com anfotericina B associada ao voriconazol (LORTHOLARY; FERNÁNDEZ-RUIZ; PERFECT, 2016). Já a fusariose sistêmica é tratada com anfotericina B, itraconazol, voriconazol posaconazol e/ou combinações (MARUKUTIRA et al., 2014).

A anfotericina B é um antibiótico macrocíclico poliênico de atividade antifúngica. Este se liga ao ergosterol na membrana plasmática das células fúngicas, causando um desarranjo e formando poros ou canais que alteram a permeabilidade celular. Os poros ou canais formados permitem o extravasamento do conteúdo intracelular, havendo perda de pequenas moléculas (GOODMAN e GILMAN, 2012).

Os antifúngicos azólicos inibem a ação da enzima microssômica 14- α -esterol-desmetilase, enzima do citocromo P450 (CYP). Consequentemente, a biossíntese do ergosterol é comprometida havendo acúmulo de 14- α -metilesteróis, o que causa um desarranjo na membrana plasmática da célula, impedindo o crescimento do fungo. Os azólicos podem ser divididos em duas subclasses: os imidazóis (cetoconazol, miconazol e tioconazol) e os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol posaconazol e isavuconazol) (GOODMAN e GILMAN, 2012; SKIADA et al., 2018). Apesar dos azóis serem apontados como primeira opção no tratamento e na profilaxia de infecções fúngicas, o uso prolongado (semanas ou meses) pode causar fortes efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade, ginecomastia, alopecia, diminuição da libido, oligospermia, azoospermia, impotência, hipocalcemia, hiponatremia e insuficiência adrenal (BENITEZ; CARVER, 2019).

Outro fármaco considerado de primeira linha para o tratamento de micoses superficiais é a terbinafina, devido ao seu perfil micológico e

farmacocinético favorável. A terbinafina age sob a enzima esqualeno epoxidase, inibindo a síntese de ergosterol, importante componente estrutural da membrana celular fúngica (BHATIA et al., 2019). Recentemente, houve um aumento na incidência de resistência à terbinafina, devido ao aumento de falha clínica terapêutica e o uso descontrolado de antimicrobianos (RAVINDRA BABU et al., 2017).

O antifúngico tópico comercial ciclopirox olamina desenvolvido há mais de trinta anos é empregado no tratamento de diversas infecções humanas devido ao seu excelente perfil de segurança e por mostrar amplo espectro de ação. A formulação de esmaltes com ciclopirox é uma alternativa valiosa de tratamento em casos de onicomicose (PIRACCINI et al., 2020). Apesar dos múltiplos usos potenciais do ciclopirox, não se conhece seu alvo específico e mecanismo de ação (CARLSON-BANNING et al., 2013). Análise genética em *Saccharomyces cerevisiae* identificou quatorze mutantes mais suscetíveis à ciclopirox olamina. As mutações estão relacionadas aos genes que codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA, reparo do DNA, transporte celular, estresse oxidativo e transdução de sinais (CARLSON-BANNING et al., 2013).

Quase todas as espécies de *Fusarium* estão entre os fungos que possuem características estruturais e funcionais inerentes de resistir aos antifúngicos sem a exposição prévia, a denominada resistência intrínseca. Foi observada resistência para anfotericina B, itraconazol, fluconazol e equinocandinas, e a razão pela qual esse fenômeno ocorre no referido gênero ainda é desconhecida (LAGUDAH; KRATTINGER, 2019).

Apesar dos mecanismos moleculares de resistência intrínseca em *Fusarium* ainda serem pouco conhecidos, um mecanismo molecular foi proposto para resistência e/ou altas CIM aos azóis. A deleção do gene CYP51 em *F. graminearum* (parálogos de esteroide 14 α -desmetilase) resultou em sensibilidade aos azóis (FAN et al., 2013). Além disso, a superexpressão de bombas de efluxo de drogas também foram associadas à resistência aos azóis (CORDEIRO et al., 2020).

A multirresistência intrínseca desses fungos é de importância médica pois interfere diretamente no sucesso do tratamento na clínica, que é particularmente difícil em pacientes com imunossupressão ou que apresentam doenças hematológicas (AL-HATMI et al., 2018a). Além da resistência intrínseca do patógeno, o tratamento da fusariose é desafiador devido à escassez de dados

de ensaios clínicos com os agentes antifúngicos disponíveis (LAGUDAH; KRATTINGER, 2019).

Os avanços recentes na busca por novos antibióticos são inadequados para lidar com a taxa crescente de cepas de microrganismos resistentes que estão emergindo. Para limitar este problema de saúde pública, há a necessidade de desenvolver novos agentes antimicrobianos mais eficazes (LIU et al., 2015; WAINWRIGHT et al., 2017).

1.3 – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A terapia fotodinâmica (TFD) foi inicialmente desenvolvida para o combate de tumores malignos e benignos. A sugestão de usar a TFD para a destruição microbiana tornou-se realidade em meados da década de 1990, já que as células de bactérias se replicam em uma taxa muito alta, muito parecida a taxa das células malignas (AMOS-TAUTUA; SONGCA; OLUWAFEMI, 2019). Na terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), os fotossensibilizadores (FSs) são moléculas intencionalmente não-tóxicas, inativas no seu estado fundamental e, quando iluminados, não são genotóxicos ou mutagênicos (DOUGHERTY et al., 1998). Diversos FSs dos grupos químicos fenotiazínicos, clorinas, porfirinas e ftalocianinas são desenvolvidos para tratamentos de infecções fúngicas (CALZAVARA-PINTON et al., 2012). As moléculas dos FSs são capazes de absorver e transferir elétrons para o oxigênio molecular após a absorção da luz. Assim, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente oxigênio singleto, que oxidam alvos microbianos não específicos (WAINWRIGHT et al., 2017; ZHOU et al., 2018). Outra importante ERO é a hidroxila radicalar que, somada ao oxigênio singleto, mata a célula alvo por estresse oxidativo (figura 2) (DE OLIVEIRA et al., 2010).

Os FSs propostos inicialmente para uso na TFDA foram rosa bengala (COSSU et al., 2016), perilenoquinonas e sais de fenotiazínio (WAINWRIGHT et al., 2017). Os primeiros corantes de fenotiazínio, tionina e azul de metileno (MB), foram descritos como colorantes de amostras biológicas em microscopia biomédica. O MB é um corante catiônico fenotiazínio bem conhecido e versátil que é aprovado e utilizado no tratamento clínico (por exemplo, demência, câncer e quimioterapia antimicrobiana) (DAI et al., 2012; WAINWRIGHT et al., 2017).

Apesar da enorme confiança existente nos FSs comerciais, o estudo de novas moléculas, incluindo novos derivados do MB, traz grandes melhorias no uso como antimicrobianos (PAZIANI et al., 2019; WAINWRIGHT et al., 2015; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002).

O novo azul de metileno (NMBN) é um FS derivado do MB e foi inicialmente usado na coloração de rotina dos reticulócitos (WAINWRIGHT et al., 2017). O NMBN é um fotoantimicrobiano ativo *in vitro* contra *Trichophyton* spp. (RODRIGUES et al., 2012) e *Candida* spp. (RODRIGUES et al., 2013), e é uma abordagem viável para profilaxia e tratamento de infecções cutâneas causadas por *C. albicans* (DAI et al., 2012). O azul de toluidina O (TBO) é um corante fenotiazínico, representado por uma molécula catiônica com estrutura fundamental composta por um anel aromático tricíclico planar (TREMBLAY et al., 2002). Além disso, TBO é usado como FS para inativar microrganismos por irradiação em biofilmes. No entanto, poucos estudos enfocaram os efeitos da TFDA por TBO na adesão de microrganismos e formação de biofilme (LI et al., 2017). O FS S137, também denominado DO15 (1,11-dietil-2,2,4,8,10,10-hexametil-1,2,3,4,8,9,10,11-octa-hidroipirido [D3,2-b: O hidrogenossulfato de 2', 3' -i] fenotiazínio) é um derivado pentacíclico não comercial do MB que é baseado na incorporação de tetrahydroquinolinas (WAINWRIGHT; MEEGAN; LOUGHRAN, 2011). Este derivado do MB foi estudado *in vitro* na fotoinativação de bactérias e fungos. O S137 é eficaz contra a bactéria Gram-positiva *Propionibacterium acnes* (RODRIGUES et al., 2012) e espécies fúngicas do gênero *Trichophyton* (RODRIGUES et al., 2012), *Candida* (RODRIGUES et al., 2013), *Colletotrichum* (DE MENEZES et al., 2014), *Fusarium* (DE MENEZES et al., 2016) e *Neoscytalidium* (TONANI et al., 2018).

As vantagens da inativação fotodinâmica antimicrobiana são a dupla seletividade (localização da luz e do FS), o desenvolvimento muito improvável de resistência microbiana e atividade eficiente em cepas multirresistentes (WAINWRIGHT et al., 2017).

Figura 2: Diagrama de Jablonski. Fonte: Adaptado de Dai et al., 2012.

1.4 - Modelo alternativo para análise de virulência *Galleria mellonella*

Galleria mellonella é um inseto que pertence à Ordem Lepidóptera e é conhecida como a “traça da cera”, sendo uma das principais pragas de colmeias, causando importante prejuízo na apicultura. O seu ciclo de vida compreende o ovo, a larva, a pupa e o adulto. Cada fase do ciclo na temperatura de 25°C dura em média, respectivamente, 10, 30, 15 e 10 dias. A fase larval é a mais longa durante o ciclo de vida holometábolo e apresenta 6 instares (fases larvais) (MYLONAKIS, 2008). Resumidamente, as larvas no sexto instar apresentam seis patas verdadeiras no tórax (ganchos), oito pró-patas (ventosas) no segmento abdominal, um tubo digestivo completo, vaso sanguíneo dorsal (sistema circulatório aberto), glândulas de seda (produção de pré-pupa) e um sistema nervoso subesofágico, formado por um cordão nervoso ventral com gânglios e uma hemocela (DURIEUX et al., 2021). A hemocela compreende por toda a porção interna do animal, que promove fluxo da hemolinfa, importante para a circulação de nutrientes e gases em todos os tecidos. Na hemolinfa, pode-se encontrar diversas células de defesa, peptídeos antimicrobianos e demais nutrientes (JORDÃO et al., 2018) (figura 3).

Figura 3: Anatomia de uma larva de *Galleria mellonella* no 6º instar de desenvolvimento. Fonte: Adaptada de Durieux e colaboradores (2021).

As larvas da *G. mellonella* são de baixo custo, não requerem enjaulamento específico e são fáceis de manusear, apresentando uma grande vantagem ao modelo alternativo *Drosophila melanogaster* (LÓPEZ HERNÁNDEZ et al., 2015; TSAI; LOH; PROFT, 2016). Além disso, as larvas podem ser mantidas a 37°C, sendo essa uma outra grande vantagem sobre o modelo de *Caenorhabditis elegans* (CHAMPION; WAGLEY; TITBALL, 2016).

O modelo alternativo de infecção *G. mellonella* tem atraído a atenção da comunidade científica nos últimos anos devido às inúmeras vantagens que proporciona para o estudo de virulência de diversos microrganismos. Esse modelo tem se tornado cada vez mais popular, com mais de 2.400 artigos científicos publicados (termos de pesquisa “*Galleria mellonella*”, “*Galleria mellonella* Infection Model” e “*Galleria mellonella* *Fusarium*” no site Pubmed - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) (figura 4) (dados do autor).

Figura 4: Publicações entre o ano de 2010 e 2020 que mencionam *G. mellonella* no banco de dados Pubmed. Fonte: autoria própria, a partir de relatórios gerados no [website: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) com os termos “*Galleria mellonella*”, “*Galleria mellonella* Infection Model” e “*Galleria mellonella* *Fusarium*”

Modelos vertebrados, como os mamíferos roedores, são comumente utilizados na análise de virulência de microrganismos patogênicos e são o padrão ouro em estudos clínicos e experimentos *in vivo* para um melhor entendimento da fisiopatologia das doenças infecciosas. Entretanto, tais modelos são de alto custo, com elevado tempo para de manutenção e geração de resultados. Além disso, requerem um minucioso processo de aprovação de comitês de bioética em pesquisa animal (MYLONAKIS et al., 2005). Até o presente momento, as regras bioéticas vigentes não se aplicam ao uso de insetos e nematoides (DURIEUX et al., 2021; SCULLY; BIDOCHKA, 2006).

Comparado com outros hospedeiros não vertebrados, tais como os nemátodos, os insetos têm um sistema avançado de defesas antimicrobianas e produzem informações relevantes no processo de infecção, bem como ocorre com os mamíferos (SHEEHAN; KAVANAGH, 2018). Em *G. mellonella*, as células circulantes são chamadas de hemócitos e são capazes de fagocitar ou encapsular invasores microbianos. As respostas humorais incluem a produção induzível de lisozima e pequenos peptídeos antibacterianos (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013a).

Slater e colaboradores (2011) relatam que a virulência de mutantes de *A. fumigatus* tem sido tradicionalmente avaliada pela utilização mamíferos. Porém, o modelo de virulência com larvas do sexto instar de *G. mellonella* mostraram alta similaridade com o perfil de virulência em mamífero. Os autores pontuam, ainda, que a triagem de *A. fumigatus* geneticamente modificados são

importantes para reduzir significativamente o número de mamíferos necessários para avaliar as alterações no perfil de virulência. Portanto, *G. mellonella* é utilizada em pesquisas com fungos patogênicos e além de teste de virulência, existe a possibilidade de avaliar a eficácia de tratamento com diversos antifúngicos e testes de toxicidade de compostos (JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000; SLATER et al., 2011). Diante do aumento de casos de pacientes imunocomprometidos, o aumento de casos de fusarioses em humanos e o surgimento de espécies com importância clínica, faz-se necessário a melhor compreensão do perfil genotípico e fenotípico de cepas clínicas de *Fusarium* sp., no Estado de São Paulo, Brasil.

2 – Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Analisar e caracterizar os isolados clínicos de *Fusarium* spp. provenientes de infecções em pacientes do Estado de São Paulo, Brasil.

2.2 - Objetivos específicos

- (i) Realizar a identificação molecular dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.;
- (ii) Realizar a identificação dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. por *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) e comparar com a identificação molecular;
- (iii) Avaliar a formação do biofilme dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.;
- (iv) Avaliar a susceptibilidade dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. aos antifúngicos e à terapia fotodinâmica antimicrobiana com fotossensibilizadores fenotiazínicos;
- (v) Analisar a virulência dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. no modelo experimental *Galleria mellonella*;
- (vi) Avaliar a terapia fotodinâmica antimicrobiana com fotossensibilizadores fenotiazínicos no modelo experimental *Galleria mellonella* infectada com isolados clínicos de *Fusarium* spp.

3 – Material e métodos

3.1 – Isolados clínicos e condições de cultura

Os isolados clínicos deste estudo foram obtidas de amostras biológicas (unha, pele, sangue e líquido peritoneal) de pacientes com infecções superficiais e sistêmicas, entre 2001 e 2017. Um total de 108 isolados clínicos de *Fusarium* spp. foram estudados e, entre eles, 39 são da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) em São José do Rio Preto, SP, Brasil (figura 5 a), 54 do Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (SAC / FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil, um isolado clínico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC / FMRP) - USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil e 14 do Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, SP, Brasil (figura 5). As linhagens controle foram *Fusarium keratoplasticum* INCQS 40099 (ATCC 36031) e *F. oxysporum* (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) 40144 (ATCC 48112).

Todas as linhagens foram inoculadas em meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) (Becton, Dickinson Company, EUA) e incubadas a 28°C por 3 a 5 dias. Os microconídios foram coletados com solução salina esterilizada e tamponada com salina fosfato (PBS), pH 7,4 e filtrados com Miracloth com poros de 22 a 25 µm (Merck EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) autoclavado. Os microconídios foram contados com um hemocitômetro e a suspensão foi preparada com PBS autoclavado.

Este estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP / USP com o n° 2.310441 / CAAE 70079517.8.0000.54.03 em 02 de outubro de 2017. Todos os isolados clínicos estão depositados na coleção do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP e na Colección Chilena de Cultivos Tipo (CCCT) (www.ccct.cl/), Temuco, La Araucanía, Chile.

Figura 5: Áreas de coleta do material biológico no Estado de São Paulo, Brasil. a. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP); b. Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - SAC / FCFRP da Universidade de São Paulo - USP) e (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - HC / FMRP da Universidade de São Paulo - USP); e c. São Paulo (Instituto Adolfo Lutz - IAL). Fonte: autoria própria.

3.2 – Análise morfológica dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.

3.2.1 - Análise macromorfológica

A análise macromorfológica foi realizada por meio da observação das características, como o aspecto, a cor, a superfície e o tamanho da colônia gigante. Os isolados clínicos foram inoculados em placa de Petri de 90 x 15 mm, contendo meio de cultura PDA e incubadas a 37°C por 48 h. Após este período, as suspensões de conídios foram coletados com auxílio de uma pipeta Pasteur e água bidestilada autoclavada e filtrada com seringa e lã de vidro autoclavada.

Em uma placa de Petri de 150 x 15 mm contendo meio de cultura YAG, foram inoculados 10 µL da suspensão de conídios a 1×10^6 conídios/mL de cada isolado clínico no centro de cada placa e incubado a 37°C por 96 horas.

3.2.2 - Análise micromorfológica

A análise micromorfológica foi realizada pelo microcultivo dos microconídios dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. sobre uma fina camada (0,5 cm) de meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) (Becton, Dickinson Company, EUA) sobre uma lâmina esterilizada. Acima do inóculo de conídios foi colocada uma lamínula esterilizada e incubado em câmara úmida a 37°C por 24 h ou até a formação das estruturas de reprodução assexual. Após, a lamínula foi removida e transferida para uma lâmina contendo uma gota de lactofenol azul de algodão.

Os microconídios, macroconídios, conidióforos e hifas foram observados em microscopia óptica no aparelho Observer Z 1 (Carl Zeiss Jena, Alemanha), aumento de 400X e capturados com a câmera HDCE-X5 e com o auxílio do software ScopiImage 9.0. A identificação morfológica dos fungos seguiu a chave taxonômica e os guias disponíveis para as espécies de *Fusarium* (LESLIE; SUMMERELL, 2007).

3.3 - Extração do DNA genômico de *Fusarium* spp.

A extração do DNA genômico de *Fusarium* spp. foi realizada de acordo com modificações do método descrito por Junghans e Metzlaß (1990). Culturas de *Fusarium* spp. crescidas em meio de cultura líquido Potato Dextrose (Becton, Dickinson Company, EUA) por 16 h a 37°C e 120 rpm (MAX Q 4000, Thermo Fisher Scientific) foram filtradas à vácuo em papel de filtro, congeladas em nitrogênio líquido e trituradas com o auxílio de almofariz e pistilo esterilizado. Cerca de 500 µL de tampão de extração de DNA (Triton X-100 2% (p/v), SDS 1% (p/v), cloreto de sódio 1 mM, EDTA 75 mM, tris-HCl pH 8,0 e água ultrapura q.s.p.) genômico foi adicionado ao micélio triturado seguido da adição de igual volume de fenol:clorofórmio 1:1 (v/v). A mistura foi homogeneizada por cerca de 10 min em agitador mecânico de tubos e centrifugada por 15 min a 12000 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e igual volume de clorofórmio foi adicionado. Após homogeneização, foi centrifugado 5 min a 12000 g. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e o DNA foi precipitado com a adição de igual volume de isopropanol e centrifugado 1 min a 12000 g. O *pellet*

foi lavado com etanol 70% e após a remoção de todo o etanol, o DNA foi eluído em água ultrapura e tratado com 300 ng/ml de RNase por 1 h a 37°C. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas em espectrofotômetro de acordo com Sambrook e Russell (2001). A integridade do material genético foi verificada por fracionamento em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA).

3.4 – Identificação molecular dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.

A identificação molecular foi realizada pelo sequenciamento da região espaçador interno do transcrito (*internal transcribed spacer* - ITS) do DNA ribossomal e do gene do fator de alongamento 1 alfa (*elongation factor 1 α* - EF1 α). Para isso, o DNA genômico foi extraído dos micélios cultivados em meio de cultura líquido Potato Dextrose (PD) (Becton, Dickinson Company, EUA) por 16 h a 37°C, agitador a 120 rpm (MAX Q 4000, Thermo Fisher Scientific). As reações em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) foram realizadas com TransTaq® DNA Polymerase High Fidelity (TransGen Biotech) com os iniciadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5' TCC TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3 ') (650 pb) (White et al., 1990) para a amplificação da região ITS e EF-1 α _F (5' ATG GGT AAG GA (A / G) GAC AAA GAC 3 ') e EF-1 α _r (5' AGG AAC CCT TAC CGA GCT C 3 ') (1200 pb) (PARK et al., 2011) para a amplificação parcial do gene EF1 α .

Os produtos das PCRs purificadas foram sequenciados usando os respectivos iniciadores no sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies - Applied Biosystems). As sequências foram analisadas e comparadas com as sequências depositadas no banco de dados *GenBank* no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A análise filogenética histórica evolutiva foi inferida pelo método do grupo de pares não ponderados com médias aritméticas (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* - UPGMA) usando as sequências ITS e EF1 α para cada isolado, que gerou um dendrograma com base na distância *P*. As análises filogenéticas foram realizadas usando o software MEGA 6.0 (www.megasoftware.net/).

3.5 – Identificação dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. por MALDI-TOF MS

A identificação por *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) foi realizada de acordo com Rodriguez e colaboradores (2019), com modificações. Resumidamente, microconídios dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. foram inoculadas em meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA - BD Difco TM, Fisher Scientific) e incubadas a 28°C por 5 dias. Os micélios, macroconídios e microconídios foram transferidos da placa de Petri para microtubos de 1,5 ml contendo 500 µl de etanol a 70% (v/v) (Sigma-Aldrich) e pérolas de vidro de 3 mm (Sigma-Aldrich).

Posteriormente, os microtubos foram agitados no vortex por 5 minutos e sonicados na temperatura ambiente em amplitude de 50% em campo pulsado por 10 minutos (Banho ultrassônico, 7Lab, Brasil). Este procedimento foi realizado duas vezes, a fim de quebrar a parede celular dos fungos e expor as proteínas. Então, 1 µl foi transferido dos microtubos para a superfície das placas de aço inoxidável MALDI (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e incubado em temperatura ambiente até secar. Após, 1 µl da matriz (75 mg ml⁻¹ de ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (Sigma-Aldrich) em etanol (Sigma-Aldrich), água bidestilada e acetonitrila (Sigma-Aldrich) (1:1:1) com 0,03% (v/v) de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich) foi misturado em cada amostra na placa de aço inoxidável MALDI e incubação até secagem à temperatura ambiente.

Os espectros de massa foram obtidos usando o equipamento MALDI-TOF MS Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de laser de feixe inteligente (334 nm). As análises foram realizadas no modo linear com polaridade positiva, tensão de aceleração de 20 kV e extração com atraso de 220 ns. Cada espectro foi coletado como uma média de 1200 disparos a laser com energia suficiente para produzir bons espectros sem saturação na faixa de m / z de 2.000 a 20.000.

Antes da análise, o equipamento foi calibrado externamente com o padrão de calibração de proteínas I (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) (insulina, ubiquitina, citocromo C e mioglobina) com o software FlexControl 1.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas com o software MALDI Biotyper Compass 4.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha)

na faixa de m/z 2.000-10.000 em comparação com a biblioteca de identificação de fungos filamentosos (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os resultados das identificações foram apresentados como escores logarítmicos entre 0,000 e 3.000. Escores acima de 1.700 foram considerados alta similaridade.

A semelhança dos espectros entre cada cepa clínica de *Fusarium* sp. foram dados pela correspondência relativa ou absoluta do sinal de massa de cada cepa. O dendrograma de similaridade espectral foi criado pelo algoritmo de aglomeração com o software MALDI Biotyper Compass 4.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.6 – Ensaio de formação de biofilme dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.

Para a formação do biofilme, uma suspensão de microconídios de cada isolado clínico de *Fusarium* sp. foi ajustada para a concentração final de 1×10^6 microconídios ml^{-1} em 200 μL de meio de cultura RPMI 1640® (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, EUA) tamponado com ácido pro-panesulfônico 0,165 M 3-(N-morfolino) (MOPS), pH 7,0 em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços e incubadas a 28°C por 24 horas. Após, os poços foram lavados três vezes com PBS e o biofilme foi incubado com metanol a 100% (v/v) (Sigma-Aldrich) por 15 minutos.

A biomassa do biofilme dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. foi medida de acordo com Sav e colaboradores (2018) e a matriz do biofilme de *Fusarium* spp. foi medida de acordo com Costa-Orlandi e colaboradores (2014), com modificações.

Para medir a biomassa, o biofilme incubado com metanol foi centrifugado, corado com 0,5% (p/v) de cristal violeta (Sigma-Aldrich) por 2 minutos e lavada duas vezes com PBS 1X. O corante incorporado pela biomassa do biofilme foi removido por incubação com 33% (v/v) de ácido acético (Merk) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços e a absorbância de cada poço foi medida a 570 nm em um espectrofotômetro de microplaca (Epoch, BioTec™).

Para medir a matriz extracelular, o biofilme incubado com metanol foi centrifugado, corado com 1% (p/v) de safranina (Merk) por 5 minutos e o corante incorporado pela matriz foi removido por incubação com 33% (v/v) de ácido acético (Merk) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma nova

placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços e a absorbância de cada poço foi medida a 492 nm no espectrofotômetro Epoch (BioTek™).

Os resultados de absorbância obtidos para cristal violeta e safranina foram utilizados para confecção de gráficos de correlação (matriz x biomassa). Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 para o método de Pearson. As distribuições entre os grupos foram comparadas e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores onde $P \leq 0,05$.

3.7 – Teste *in vitro* da susceptibilidade dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. aos antifúngicos

Os testes de susceptibilidade de *Fusarium* spp. foram conduzidos de acordo com o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com modificações. Os antifúngicos utilizados foram anfotericina B (0,5 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich), ciclopirox olamina (0,5 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich), itraconazol (0,5 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich), voriconazol (0,5 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich) e terbinafina (0,125 a 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich). Os experimentos foram realizadas em placas de microdiluição de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça) com meio de cultura RPMI1614 (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, EUA) tamponado com ácido pro-panesulfônico 0,165 M 3-(N-morfolino) (MOPS), pH 7,0 e 2×10^4 microconídios mL^{-1} , a 28°C por 48 h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 100% do crescimento fúngico da anfotericina B e 90% do crescimento fúngico dos azóis, terbinafina e ciclopirox olamina. As médias geométricas (MG) e as faixas de CIM foram calculadas para cada espécie e antifúngico. A cepa controle padrão do experimento foi *Aspergillus flavus* (ATCC 204304). Os valores das CIMs foram avaliados considerando o valor de corte epidemiológico (*epidemiological cutoff value* – ECV) preconizado por ESPINEL-INGROFF et al. (2016). Valores acima do ECV são considerados não selvagem, isto é, possível resistência ao tratamento antifúngico. As CIMs consideradas ECV para FSSC são de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B, 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para itraconazol e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para voriconazol. Para FOSC e FFSC, as CIMs consideradas ECV são de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B, 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para itraconazol e 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para voriconazol. As CIMs consideradas ECV para FDSC são de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B, 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para itraconazol e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para voriconazol.

(ESPINEL-INGROFF et al., 2016). Não há estudos demonstrando ECV para ciclopirox olamina e terbinafina.

3.8 – Teste *in vitro* da susceptibilidade dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. a terapia fotodinâmica antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) com fotossensibilizadores (FSs) fenotiazínicos foi avaliada para os isolados clínicos de *Fusarium* spp. A escolha dos isolados clínicos para o experimento foi baseada naqueles que apresentaram altos valores de MG CIM para os antifúngicos. Assim, foram selecionados três isolados clínicos de *Fusarium* sp. para esta análise. São estes: LMC7150.01, *F. keratoplasticum*; LMC7138.01, *F. proliferatum*; e LMC7145.02, *F. oxysporum*. Como controle do experimento foi utilizado *F. keratoplasticum* INCQS 40099 (ATCC 36031).

A TFDA foi realizada com os FSs fenotiazínicos azul de metileno (MB), novo azul de metileno N (NMBN), azul de toluidina (TBO) e o FS pentacíclico S137. Os três primeiros foram adquiridos na Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EUA) e o terceiro foi sintetizado como descrito em Wainwright e colaboradores (2011). As soluções de cada FS e as respectivas diluições foram preparadas com PBS 1X pH 7,4 autoclavado.

Em uma placa de microdiluição de 96 poços, foram pipetados 50 µL dos FSs em diferentes concentrações. O gradiente de concentrações para os FSs MB, TBO e NMBN foi 200; 150; 100; 75; 50; 37,5; 25; 18,8; 12,5; 9,4 µM e para S137 foi 100; 75; 50; 37,5; 25; 18,8; 12,5; 9,4; 6,3; 4,7 µM. Após adição de 50 µL da suspensão de microconídios (10^5 UFC mL⁻¹) em cada poço, a placa de 96 poços foi mantida no escuro por 30 minutos (período de pré-incubação), em seguida exposta à luz no aparelho com arranjos de 96 LEDs, em um comprimento de onda entre 600 a 650 nm (pico em 635 nm), irradiância de 0,01523 W cm⁻². A exposição ocorreu por 16 minutos e 24 segundos que corresponde a fluência de 15 J cm⁻². Após, foram adicionados 100 µL de RPMI1640 pH 7,0 (com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol) tamponado com 0,165 M de ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS) (2x a concentração final). Após essa adição a concentração final de conídios ficou $2,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹, como estabelecido pelo protocolo M38-A2 do CLSI. Posteriormente, as placas foram incubadas a 27°C no escuro e o crescimento

avaliado após 48 horas. Para todos os FSs testados foi feito o controle sem exposição à luz (escuro). A CIM foi definida como a menor concentração do tratamento que visualmente inibe o crescimento do microrganismo. Foi realizada duas réplicas biológica. Todo experimento foi realizado em duplicata.

3.9 – Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana pela fração de sobrevivência dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.

A TFDA foi realizada com o FS fenotiazínicos MB (Sigma-Aldrich). Os isolados clínicos foram representantes de cada complexo de espécie de *Fusarium* analisados neste estudo e que apresentaram altas CIM na TFDA com MB (FOSC, *F. oxysporum* - LMC7137.01, FFSC, *F. proliferatum* - LMC7138.01, FSSC, *F. petrophilum* - LMC7168.01 e FDSC, *F. delphinoides* - LMC7215.01) e linhagem controle *Fusarium keratoplasticum* (FSSC, ATCC 36031).

Em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 125 µL de suspensão de microconídios de *Fusarium* spp. a 2×10^6 UFC mL⁻¹ previamente filtrados em Miracloth com poros de 22 a 25 µm (Merck EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) autoclavado e 125 µL do FS MB. A concentração do MB foi previamente estabelecido baseado nos ensaio de microdiluição em caldo onde a CIM foi determinada. Os microtubos foram pré incubados na temperatura ambiente no escuro por 30 minutos. Em seguida, 100 µL de cada suspensão foram colocados em placas de 96 poços, para que fossem posteriormente exposto à luz no aparelho com arranjos de 96 LEDs, em um comprimento de onda e 631 nm, por 16 minutos e 24 segundos que corresponde a fluência de 15 J cm⁻². Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas (10^{-1} e 10^{-2}) e 50 µL de cada diluição foram espalhados na superfície de 7 mL de ágar batata (PDA), suplementado com 0,12 g L⁻¹ de ácido deoxicólico (Fluka, Itália), em placas de Petri (60 x 15 mm). O ácido deoxicólico reduz o crescimento radial das colônias, tornando-as mais definidas o qual permite acompanhar o desenvolvimento dos fungos por um período maior de tempo. As placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das colônias iniciou-se após 24 horas, com auxílio de estereomicroscópio (com ampliação de 8x) – Modelo SZX7, Olympus e estendida até 3 dias de desenvolvimento. Controles nos quais as células foram expostas apenas à luz, na ausência do MB, e controles nos quais as células foram tratadas com o MB, mas não foram expostas à luz (escuro), foram preparados concomitantemente. A fração de sobrevivência foi

obtida pelo cálculo da divisão do número de colônias (n), pelo número de colônias do controle não tratado com MB e não exposto à luz (escuro) (n₀). Foram construídos gráficos considerando os valores obtidos, onde o eixo X consistiu a terapia e o eixo Y, a fração de sobrevivência em escala logarítmica. As linhagens de *Fusarium* spp. que não originaram colônias após 3 dias, foram consideradas mortas pela terapia. Os resultados da fração de sobreviventes foram expressos em "log de redução", um termo matemático utilizado para demonstrar o número relativo de células eliminadas de uma determinada terapia comparada com o controle não tratado. Por exemplo, 1-log de redução representa 10 vezes, 2-log de redução representa 100 vezes, 3-log de redução representa 1000 vezes, 4-log de redução representa 10000 vezes e 5-log de redução, significa uma redução de 100 mil vezes do inóculo inicial ou morte de 90,0%, 99,0%, 99,9%, 99,99% e 99,999%, respectivamente, de microconídios tratados. Foram realizadas três réplicas biológicas e em duplicata.

3.10 – Estudo da virulência dos isolados clínicos de *Fusarium* em modelo alternativo *Galleria mellonella*

Para caracterizar o perfil de virulência dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. em modelo *Galleria mellonella*, adotou-se o protocolo estabelecido por (PAZIANI et al., 2019). Os autores apontam a relevância do uso de insetos em ensaios de virulência de fungos devido a alta similaridade das células imunes inatas de mamíferos e os hemócitos de invertebrados. Neste trabalho as larvas foram mantidas a 28°C no escuro, em recipiente de vidro (30 cm altura – 20 cm largura) com capacidade de 2 L. As larvas foram mantidas com acesso a ração (até alcançarem o sexto instar e peso 225 ± 25 mg) e oxigenação apropriada. A ração para as larvas é composta de 200 g de cera de abelha, 96 g de leite em pó, 188 g de extrato de levedo, 385 g de fubá, 416 mL de mel, 160 g de soja triturada e 300 mL de água bidestilada (dH₂O). Os componentes da ração foram misturados no fogo alto e devidamente autoclavado. Após o completo desenvolvimento larval, as larvas foram privadas da alimentação e separadas em grupos de 10 unidades em placa de Petri de vidro para cada isolado clínico, terapias e controles. Para os testes, todas as larvas foram inoculadas com 5 µl ou 1 × 10⁶ microconídios/mL, além do PBS (pH 7,4) como controle negativo, com o auxílio micro seringa de Hamilton modelo

7000.5KH de volume de 10 µL. Para cada larva, inoculou-se no centro da ventosa da última pró-pata direita, no sentido anteroposterior para alcançar a hemocele.

Entre as inoculações, uma rigorosa bateria de lavagem foi realizada 3 vezes com hipoclorito de sódio, etanol 70% e água autoclavada. Após a fase de inoculação artificial, as larvas foram incubadas a 37°C, privadas de ração e iluminação direta. O mesmo foi feito para os controles positivo e negativo, ATCC e PBS (pH 7,4).

Os testes de virulência foram realizados quanto aos isolados clínicos que apresentam diferentes capacidades de formação de biofilme e quanto ao sítio anatômico da infecção.

Os isolados clínicos para avaliar a virulência quanto a formação de biofilme, foram selecionados pelo critério de maiores e menores formadores de biofilme (figura 12). Como alto formador de biofilme foram selecionados os isolados clínicos de *F. keratoplasticum* LMC7119.01 e LMC7129.01; *F. solani* LMC7144.01 e LMC7182.01; *F. falciforme* LMC7177.01 e LMC7210.01); e *F. delphinoides* LMC7215.01. Como baixo formadores de biofilme foram selecionados os isolados clínicos de *F. keratoplasticum* LMC7133.01, LMC7134.01; *F. solani* LMC7157.01 e LMC7181.01; *F. falciforme* LMC7112.01 e LMC7102.01; *F. oxysporum* LMC7117.01 e LMC7124.01; *F. petroliphilum* LMC7168.01; e *F. proliferatum* LMC7138.01. Como controle utilizou-se *F. keratoplasticum* INCQS 40099 (ATCC 36031).

Para avaliar o perfil de virulência a partir do sítio anatômico da infecção, foram selecionadas isolados clínicos de *F. solani* e *F. keratoplasticum* que fossem representativos de fusarioses sistêmicas e de micoses superficiais. Para *F. solani*, selecionou-se os isolados clínicos provenientes das vias hematogênicas (LMC7157.01), ascite (LMC7144.01), onicomiose (LMC7182.01) e dermatomicose (LMC7181.01). Para *F. keratoplasticum*, selecionou-se os isolados clínicos proveniente das vias hematogênicas (LMC7158.01), onicomiose (LMC7146.01) e dermatomicose (LMC7204.01). O protocolo para preparação das cepas, inóculos e demais condições experimentais foram baseadas segundo Paziani e colaboradores (2019).

Durante o período experimental de 7 dias, as larvas foram retiradas da pré-pupa e a cada 24 horas, a fim de retardar sua metamorfose e para realizar o levantamento da quantidade de mortes no período. O experimento foi realizado

em duas replica biológica e o resultado mais significativo foi expresso em gráfico. A confecção dos gráficos e análises estatística por meio do método Log-rank (Mantel-Cox) foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5.

3.11 – Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana no modelo experimental *Galleria mellonella* infectada com linhagens controle de *Fusarium* spp.

Para conduzir este experimento, grupos de 10 larvas de *G. mellonella* foram divididos para determinar as doses para a infecção artificial, a toxicidade da TFDA com FSs fenotiazínicos (MB, NMBN, TBO e S137) e a eficácia da TFDA para larvas infectadas com microconídios da linhagem ATCC 36031 de *F. keratoplasticum*.

A toxicidade da TFDA com os FS em *G. mellonella* foi testada com as condições das concentrações fungicidas mínimas (CFM) determinadas por De Menezes et al. (2016). Dada a distribuição de FS nas larvas, as concentrações foram convertidas em molalidade (mol Kg^{-1}), onde a massa total consistia no peso das larvas ($225 \pm 25 \text{ mg}$). A toxicidade do MB foi testada em *G. mellonella* a uma concentração final de 750, 1500 e 3000 μM . A concentração final de NMBN e S137 foram de 100, 200 e 400 μM . Cinco microlitros de cada FS foram injetados em grupos de larvas de *G. mellonella* e a concentração de MB em cada larva foi, respectivamente, 18,75, 37,5 e 75 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$. As concentrações de NMBN e S137 foram, respectivamente, 2,5, 5 e 10 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$. O grupo controle consistiu em larvas injetadas com 5 μL de PBS (pH 7,4) autoclavado. Após a injeção do FS, as larvas foram mantidas no escuro (controle positivo) ou expostas à luz (15 J cm^{-2}).

As curvas de sobrevida e a análise estatística (teste de Log-rank, Mantel-Cox) foram realizadas usando o *software* estatístico GraphPad Prism 5. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As curvas de sobrevida e a análise estatística (teste de Log-rank, Mantel-Cox) foram realizadas usando o *software* estatístico GraphPad Prism 5. As concentrações que mataram $< 50\%$ do n nos primeiros cinco dias foram consideradas não tóxicas. Os experimentos foram realizados em duplicatas e em duas réplicas biológicas.

3.12 - Avaliação da toxicidade dos fotossensibilizadores fenotiazínicos no modelo experimental *Galleria mellonella*

A toxicidade da TFDA com os FS em *G. mellonella* foi testada com as condições das concentrações fungicidas mínimas (CFM) determinadas por De Menezes et al. (2016). Dada a distribuição de FS nas larvas, as concentrações foram convertidas em molalidade (mol Kg^{-1}), onde a massa total consistia no peso das larvas ($225 \pm 25 \text{ mg}$). A toxicidade do MB foi testada em *G. mellonella* a uma concentração final de 750, 1500 e 3000 μM . A concentração final de NMBN e S137 foram de 100, 200 e 400 μM . Cinco microlitros de cada FS foram injetados em grupos de 10 larvas de *G. mellonella* e a concentração de MB em cada larva foi, respectivamente, 18,75, 37,5 e 75 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$. As concentrações de NMBN e S137 foram, respectivamente, 2,5, 5 e 10 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$. O grupo controle consistiu em larvas injetadas com 5 μL de PBS (pH 7,4) autoclavado. Após a injeção do FS, as larvas foram mantidas no escuro (controle) ou expostas à luz (15 J cm^{-2}).

As curvas de sobrevida e a análise estatística (teste de Log-rank, Mantel-Cox) foram realizadas usando o software estatístico GraphPad Prism 5. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As curvas de sobrevida e a análise estatística (teste de Log-rank, Mantel-Cox) foram realizadas usando o software estatístico GraphPad Prism 5. As concentrações que mataram $< 50\%$ do n nos primeiros cinco dias foram consideradas não tóxicas. Os experimentos foram realizados em duplicatas e em duas réplicas biológicas.

3.13 - Avaliação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em modelo alternativo *Galleria mellonella*.

A TFDA com FS fenotiazínicos foi avaliado em *G. mellonella* infectada com *F. keratoplasticum* (ATCC 36031) e *F. moniliforme* (ATCC 38159). A concentração final de microconídios injetados foi de 10^4 microconídios / larvas (5 μL de 2×10^6 microconídios mL^{-1}). A concentração final do FS foi de 750 e 1500 μM para MB, e 100 e 400 μM para S137 e NMBN. A suspensão de microconídios foi preparada em PBS (pH 7,4) autoclavado ou na própria solução do FS, na qual os microconídios e o FS foram injetados juntos em 5 μL de inóculo. O grupo controle consistiu em larvas injetadas com 5 μL de PBS (pH 7,4) autoclavado.

Imediatamente após a injeção, as réplicas dos grupos de larvas foram mantidas no escuro ou expostas à luz (15 J cm^{-2}) em uma placa acrílica de 24 poços para cultura de células (Costar Corning, Nova York, NY, EUA). Após, as larvas foram incubadas em placas de Petri de vidro a 37°C e monitoradas diariamente quanto à sobrevivência, por 10 dias.

As curvas de sobrevida e a análise estatística (teste de Log-rank, Mantel-Cox) foram realizadas usando o software estatístico GraphPad Prism 5. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As curvas de sobrevida e a análise estatística (teste de Log-rank, Mantel-Cox) foram realizadas usando o software estatístico GraphPad Prism 5. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os experimentos foram realizados em duplicatas e em duas réplicas biológicas.

3.14 – *Fungal burden* pós terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Galleria mellonella*.

O número de microconídios viáveis (*fungal burden*), ou seja, a carga de fungos recuperados da hemolinfa e a contagem total de hemócitos (CTH) foram analisados após 30 minutos da TFDA que foi conduzida a partir das seguintes concentrações: PBS1X, MB ($1500 \mu\text{M}$), NMBN ($200 \mu\text{M}$) e S137 ($200 \mu\text{M}$), mantidos no escuro ou expostos à luz (15 J cm^{-2}). Cinco larvas por grupo foram fatiadas com auxílio de bisturi estéril, a fim de coletar a hemolinfa em microtubos de 1,5 mL. A carga fúngica foi determinada pela diluição em série da hemolinfa e inoculação do material com auxílio de alça de Drigalski em ágar batata dextrose (PDA), acrescidos de $0,12 \text{ mg mL}^{-1}$ de ácido deoxicólico (Fluka, Itália) e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol em placas de Petri (60 x 15 mm). O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foram contados após 48 horas de incubação a 30°C . Os experimentos foram realizados em duplicatas e em duas réplicas biológicas.

3.15 - Contagem total de hemócitos no modelo experimental *Galleria mellonella* quanto a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

A contagem total de hemócitos (CTH) foi realizada a partir da hemolinfa das larvas de *G. mellonella*, em resposta à infecção por *F.*

keratoplasticum INCQS 40099 (ATCC 36031) e à TFDA com MB, NMBN e S137. A TFDA foi conduzida a partir das seguintes concentrações: PBS1X, MB (1500 μM), NMBN (200 μM) e S137 (200 μM), mantidos no escuro ou expostos à luz (15 J cm^{-2}). A CTH da hemolinfa de larvas de *G. mellonella* foi realizada usando o protocolo de ARTEAGA BLANCO et al. (2017). O experimento foi realizado com 3 larvas por cada condição de teste. O teste consistiu de larvas injetadas com PBS, MB, NMBN e S137. Estes grupos de larvas foram nas condições não infectado, infectados por *F. keratoplasticum* e *F. moniliforme*. Todas estas condições tiveram réplicas no escuro e exposição a 15 J cm^{-2} . Adicionalmente, houve o controle das larvas denominado *naïve* (não injetadas). A hemolinfa foi coletada a partir de larvas fatiadas com auxílio de bisturi estéril. Após, o fluído foi diluído em IPS (*insect phosphate saline* – cloreto de sódio 150 mM, cloreto de potássio 5 mM, cloridrato de Tris 100 mM pH 6,9, EDTA 10 mM e citrato de sódio 30 mM) frio. A densidade dos hemócitos foi avaliada com hemocitômetro e observada em microscopia de campo claro (N120, Coleman) em aumento de 400X. As análises estatísticas (teste *t* de *Student*) foram realizadas usando o software estatístico GraphPad Prism 5. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os experimentos foram realizados em duas réplicas biológicas em duplicata.

3.16 - Análise estatística

Os dados dos ensaios com biofilme (biomassa e matriz) e do teste de suscetibilidade aos antifúngicos foram analisados pelo GraphPad Prism, versão 5.0, para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As distribuições entre os grupos foram comparadas usando o teste *t* de *Student* bicaudal as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em valores de $P \leq 0,05$

4. Resultados

4.1 Caracterização morfológica dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.

4.1.1 - Caracterização macromorfológica dos isolados de *Fusarium* spp.

Os isolados clínicos de *Fusarium* spp. foram submetidos a análise fenotípica da macromorfologia (colônia gigante). Observou-se o aspecto, cor e superfície das colônias gigantes de cada linhagem. A figura 6 mostra a representação dos dois principais agrupamentos fenotípicos. As colorações das colônias variaram de amarela, laranja, roxa, lilás e todas as cepas apresentaram aspecto cotonoso (figura 6). As 108 cepas clínicas foram sugestivas para *Fusarium* spp. (Figura 6 a) por identificação clássica e, entre eles, 8 foram sugestivas para o complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC) (figura 6 b) pois apresentaram o verso das colônias nas colorações roxa e lilás.

Figura 6: Colônia gigante dos isolados clínicos de *Fusarium* sp. Colônias gigante (verso e anverso) dos isolados clínicos em meio de cultura PDA a 28°C por 3 - 5 dias. (A) superfície e verso das colônias de *Fusarium* spp. (B) superfície e verso das colônias dos complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC). Fonte: autoria própria.

4.1.2 - Caracterização micromorfológica dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.

A caracterização micromorfológica dos isolados clínicos de *Fusarium* sp. foi realizado por microcultivo a fim de avaliar as estruturas vegetativas e de reprodução assexual do fungo (hifas, conidióforo e conídios) (figura 7). Como resultado foi observado que os isolados clínicos apresentam conidióforos provenientes de hifas hialinas e micélio aéreo. Os macroconídios são poucos, de formato fusiforme com septações variáveis e formados a partir de conidióforos ramificados múltiplos e curtos. Os microconídios são abundantes e com até dois septos (figura 7). Assim, todos os isolados clínicos apresentaram características micromorfológicas sugestivas do gênero *Fusarium*.

Figura 7: As características micromorfológicas de *Fusarium* sp. (A e C) Conidióforos do complexo de espécies *F. solani*, (B e D) conidióforos do complexo de espécies *F. oxysporum* em meio de cultura PDA a 28°C por 2 dias. Corante lactofenol azul de algodão em microscopia óptica (400x, Observer Z 1 - Carl Zeiss Jena, Alemanha). As setas indicam septos, asteriscos indicam macroconídios. Barra de escala: 10 µm. Fonte: autoria própria.

4.2 Identificação molecular dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.

O sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal identificou os 108 isolados clínicos em quatro diferentes complexos de espécie de *Fusarium*. As espécies do FSSC são as mais abundantes, com 97 (89,8%) isolados clínicos, seguido pelas espécies do FOOSC com 9 (8,3%) isolados clínicos e as espécies do FDSC e FFSC com 1 (0,9%) e 1 (0,9%) isolados clínicos, respectivamente (ANEXO I).

As espécies dentro de cada complexo de espécie de *Fusarium* foram determinadas pelo sequenciamento do gene EF1 α . Entre os isolados clínicos do FSSC estão *F. keratoplasticum* (58; 59,7%), *F. solani* (28; 28,8%), *F. falciforme* (9; 9,2%) e *F. petrophilum* (2; 2,0%) (figura 8). No FOOSC, todos os isolados clínicos (9; 100%) são *F. oxysporum*, enquanto que para FFSC (1; 100%) e FDSC (1; 100%), os isolados clínicos são *F. proliferatum* e *F. delphinoides*, respectivamente (ANEXO I; figura 8). A relação evolutiva entre os isolados clínicos é mostrada na árvore UPGMA obtida pela sequências ITS e EF1 α de cada isolado clínico divide os 108 isolados clínicos em 2 clados diferentes (figura 9). Todas as espécies do FSSC e adicionalmente o *F. delphinoides* (FDSC) foram agrupados no mesmo clado e todas as espécies do FOOSC mais o *F. proliferatum* (FFSC) foram agrupados em outros clados (figura 9).

Figura 8: Resumo gráfico da identificação molecular (ITS e EF1 α) dos isolados clínicos dos complexos de espécies de *Fusarium* (n = 108). A. Identificação a partir do sequenciamento das regiões ITS; B. Identificação a partir do sequenciamento do gene EF1 α . Fonte: autoria própria (Paziani e colaboradores, 2020).

Figura 9: Dendrograma das sequências ITS e EF1 α concatenadas dos 108 *Fusarium* spp. Nos nós da árvore estão as porcentagens de bootstrap. Barra de escala indica substituições de nucleotídeos por local. Outgroup, *Cylindrocarpon cylindroides* cepa CBS 324.61. Fonte: autoria própria (Paziani e colaboradores, 2020).

4.2.1 – Relação sítios anatômicos de coleta e espécie do isolado clínico de *Fusarium* spp.

Neste trabalho foram estudados 108 (100%) isolados clínicos de *Fusarium* spp. de diferentes amostras biológicas e sítios anatômicos de pacientes com infecção fúngica no Estado de São Paulo, Brasil. Como resultado foi observado que 73 (67,5%) isolados clínicos foram provenientes de unhas dos pés e 4 (3,7%) provenientes de unhas das mãos. Os demais isolados clínicos são 16 (14,8%) da pele, 14 (12,9%) do sangue e 1 (0,9%) do líquido peritoneal. As espécies e os respectivos sítios anatômicos/amostra biológica de origem está listado na tabela 1.

Tabela 1: Relação de isolados identificados por biologia molecular e sítio anatômico de coleta/amostra biológica. Fonte: autoria própria.

Species Complex	Espécies	Sítio anatômico	n	%
FSSC	<i>F. keratoplasticum</i> (n=58)	Unha do pé	42	72,4
		Unha da mão	1	1,7
		Pele	9	15,5
		Sangue	5	8,6
		Líquido peritoneal	1	1,7
	<i>F. solani</i> (n=28)	Unha do pé	16	57,1
		Unha da mão	2	7,1
		Pele	3	10,7
		Sangue	7	25,0
	<i>F. falciforme</i> (n=9)	Unha do pé	8	88,9
		Pele	1	11,1
	<i>F. petroliphilum</i> (n=1)	Sangue	2	100,0
	FOSC <i>F. oxysporum</i> (n=9)	Unha do pé	6	66,7
		Unha da mão	1	11,1
		Pele	2	22,2
FFSC	<i>F. proliferatum</i> (n=1)	Unha do pé	1	100,0
FDSC	<i>F. delphinoides</i> (n=1)	Pele	1	100,0
Total			108	100,0

4.3 – Identificação fenotípica dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. por MALDI-TOF MS

O método de identificação de fungos por MALDI-TOF MS foi empregado neste estudo para determinar sua eficiência na identificação comparando com os resultados da identificação molecular. Este método fenotípico foi capaz de identificar corretamente 94,4% dos isolados clínicos (102 dos 108 isolados clínicos) deste estudo nos complexos de espécie de *Fusarium*. Os isolados não identificados foram LMC7133.01, LMC7144.01, LMC7207.01, LMC7124.01 e LMC7172.01, que correspondem, respectivamente, as espécies identificadas pelo método molecular *F. keratoplasticum*, *F. solani*, *F. keratoplasticum*, *F. falciforme*, *F. oxysporum* e *F. oxysporum*. Entre os isolados clínicos identificados pelo método MALDI-TOF MAS, 93 (86,2%) foram identificados como FSSC, 7 (6,5%) como FO SC, 1 (0,9%) como FFSC, 1 (0,9%) como FDSC e 6 (5,5 %) não foram identificados por esta metodologia (figura 10 e ANEXO I). Além disso, foram observados 5 perfis diferentes de espectros de massa para isolados clínicos do FSSC e 3 perfis diferentes de espectros de massa para isolados clínicos do FO SC (Figura 11). O agrupamento espectral do MALDI-TOF agrupou parte dos isolados clínicos de FO SC e FFSC no mesmo clado (Figura 10). Em um clado diferente, foram agrupados parte de isolados clínicos do FO SC, 4 isolados clínicos do FSSC (LMC7189.01, LMC7154.01, LMC7123.01 e LMC7207.01) e 1 isolado clínico do FDSC (LMC7215.01). Os outros isolados clínicos do FSSC foram agrupados em seis diferentes clad os (Figura 10).

Figura 11: Espectros de massas MALDI-TOF MS das espécies dos complexos de espécies de *Fusarium*. A, FSSC (*F. keratoplasticum* - ATCC 36031); B, FOSSC (*F. oxysporum* - ATCC 48112); C, D, E, F e G, isolados clínicos do FSSC; H, I e J, isolados clínicos do FOSSC; K, isolado clínico do FFSC; e L, isolado clínico do FDSC. À direita do painel é indicada a ID de cada cepa e / ou isolado clínico. Os espectros são apresentados na faixa de 2000 a 10000 Da, onde são observados os principais picos de massa. Fonte: autoria própria (Paziani e colaboradores, 2020).

4.4 – Formação de biofilme dos isolados clínicos de *Fusarium* spp.

A formação do biofilme foi avaliada através da medição da biomassa e da matriz extracelular com os corantes Cristal Violeta e Safranina, respectivamente. Com o intuito de entender a correlação existente entre os valores de absorbância da biomassa e da matriz do biofilme dos isolados clínicos, foi utilizado o Coeficiente de correlação de Pearson. A análise demonstrou uma correlação positiva significativa para estes isolados clínicos entre biomassa e matriz de biofilme ($P < 0,05$). Isto é, os resultados indicam que para a maioria dos isolados clínicos, quanto maior o valor da biomassa, maior o valor da matriz ou então, quanto menor o valor da biomassa, menor o valor da matriz do biofilme. Foi observado que entre os 59 isolados clínicos de *F. keratoplasticum*, 10 (16,9%) apresentaram correlações de absorbâncias acima de 1,0, portanto, maior formador de biofilme, em relação aos demais isolados da mesma espécie e *F. keratoplasticum* INCQS 40099 (ATCC 36031). Para os 28 os isolados clínicos de *F. solani*, 8 (28,5%) apresentam perfil de maior formador de biofilme, em relação aos demais isolados da mesma espécie e *F. keratoplasticum* INCQS 40099 (ATCC 36031). Para *F. falciforme*, 3 isolados (33,3%) apresentam perfil de maior formador de biofilme, em relação aos demais isolados da mesma espécie e *F. keratoplasticum* INCQS 40099 (ATCC 36031). Por outro lado, todos os isolados de FOSC, bem como a cepa *F. oxysporum* INCQS 40144 (ATCC 48112) apresentaram correlações de absorbâncias abaixo de 1,0 e, portanto, considerados baixos formadores de biofilme (Figura 12). O mesmo perfil foi observado para todas as espécies de *F. petrophilum*, *F. proliferatum* e *F. delphinoides*, onde as correlações de absorbâncias ficaram abaixo de 1,0 e, portanto, considerados baixos formadores de biofilme.

Figura 12: Correlação de Pearson entre os valores de absorvância da biomassa e matriz do biofilme dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. Assinalado em vermelho são isolados considerados altos formadores de biofilme ($P < 0,05$).
Fonte: autoria própria.

4.5 – Susceptibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. aos antifúngicos

A susceptibilidade *in vitro* foi avaliada com os antifúngicos anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol contra 108 isolados clínicos distribuídos em 58 *F. keratoplasticum*, 28 *F. solani*, 9 *F. falciforme*, 9 *F. oxysporum*, 2 *F. petroliphilum*, 1 *F. proliferatum* e 1 *F. delphinoides*.

Os resultados foram avaliados quanto as MGs das CIMs por espécies. Os isolados de *F. keratoplasticum* apresentaram as MGs das CIMs de 1,4; 16,7; 6,2; 5 e 15,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos, respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3). Os isolados de *F. solani* apresentaram as MGs das CIMs de 1,4; 14,5; 5,6; 4,5 e 16,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos, respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3). Para *F. falciforme*, as MGs das CIMs foram de 1,5; 17; 6,1; 4,7 e 17,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos, respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3). *F. petroliphilum* apresentou a MGs de 1,3; 12,8; 5; 3,7 e 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3). *F. oxysporum* apresentou as MGs das CIMs de 1,6; 26; 8; 6,4 e 26,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos, respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3).

Os valores de CIM 50 para *F. keratoplasticum* foram de 1; 32; 8; 8 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos, respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3). Os valores de CIM 90 para a mesma espécie foram de 2; > 128; 16; 16 e > 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos, respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3).

Para *F. solani*, os valores de CIM 50 foram de 1; 64; 8; 4 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos, respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3). Os valores de CIM 90 para a mesma espécie foram de 2; >128; 32; 16 e > 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3).

Os valores de CIM 50 para *F. falciforme* foram de 1; 8; 4; 8 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox

olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3). Os valores de CIM 90 foram de 2, 64, 16, 16 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3). FOSC apresentou valores de CIM 50 de 1; 8; 4; 8 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos, respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3). Para o mesmo complexo de espécies observou-se valores de CIM 90 de 2, 16, 8, 16 e $> 32 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os fármacos respectivamente, anfotericina B, terbinafina, ciclopirox olamina, voriconazol e itraconazol ($P < 0,05$) (tabela 3).

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. aos antifúngicos. MG CIM, média geométrica da concentração inibitória mínima; n, número de isolados clínicos; (*) valor da CIM (n=1). Fonte: autoria própria.

	n	Intervalo	MG CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CIM50	CIM90
<i>F. keratoplasicum</i>	58				
Anfotericina B		1 - 4	1,4	1	2
Terbinafina		1 - 128	16,7	32	> 128
Ciclopirox olamina		1 - 32	6,2	8	16
Voriconazol		1 - 32	5	8	16
Itraconazol		0,25 - 32	15,2	32	> 32
<i>F. solani</i>	28				
Anfotericina B		1 - 2	1,4	1	2
Terbinafina		1 - > 128	14,5	64	> 128
Ciclopirox olamina		1 - 32	5,6	8	32
Voriconazol		0,5 - 16	4,5	4	16
Itraconazol		0,5 - 32	16,5	32	> 32
<i>F. falciforme</i>	9				
Anfotericina B		0,25 - 2	1,5	1	2
Terbinafina		1 - 64	17	8	64
Ciclopirox olamina		1 - 16	6,1	4	16
Voriconazol		0,25 - 16	4,7	8	16
Itraconazol		0,5 - 32	17,3	16	32
<i>F. petroliphilum</i>	2				
Anfotericina B		1 - 2	1,3	1	2
Terbinafina		1 - 128	12,8	1	128
Ciclopirox olamina		1 - 32	5	1	32
Voriconazol		1 - 4	3,7	1	4
Itraconazol		1 - 32	14	1	> 32
<i>F. oxysporum</i>	9				
Anfotericina B		1 - 2	1,6	1	2
Terbinafina		1 - 128	26	8	16
Ciclopirox olamina		1 - 16	8	4	8
Voriconazol		1 - 16	6,4	8	16

Itraconazol		1 - 32	26,4	16	> 32
<i>F. proliferatum</i>	1	*	*	*	
Anfotericina B		2			
Terbinafina		128			
Ciclopirox olamina		32			
Voriconazol		4			
Itraconazol		32			
<i>F. delphinoides</i>	1	*	*	*	
Anfotericina B		4			
Terbinafina		4			
Ciclopirox olamina		2			
Voriconazol		> 32			
Itraconazol		1			

4.6 – Avaliação *in vitro* da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) contra os isolados clínicos de *Fusarium* spp.

O efeito da TFDA com FSs fenotiazínicos MB, NMBN, S137 e TBO foi avaliado contra isolados clínicos de *Fusarium* spp. que apresentam altas CIMs dos antifúngicos comerciais no teste de susceptibilidade *in vitro*. Os antifúngicos terbinafina, itraconazol, voriconazol, ciclopirox olamina apresentaram, respectivamente, os valores de CIM de $>16 \mu\text{g mL}^{-1}$, $>32 \mu\text{g mL}^{-1}$, $>16 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o isolado clínico *F. keratoplasticum* (LMC7150.01). Os antifúngicos itraconazol e ciclopirox olamina apresentaram os valores de CIM de $>32 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para *F. oxysporum* (LMC7122.02). Os antifúngicos terbinafina, itraconazol e ciclopirox olamina apresentaram as CIM de $>16 \mu\text{g mL}^{-1}$, $>32 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $>32 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para *F. proliferatum* (LMC7138.01). A linhagem controle *F. keratoplasticum* (ATCC 36031) apresentou CIM de $>16 \mu\text{g mL}^{-1}$ os azoles (figura 13).

Como resultado, observamos que os FSs no escuro não inviabilizam os microconídios dos isolados clínicos de *Fusarium* sp., com exceção de S137 que foi tóxico para o isolado clínico *Fusarium proliferatum* (LMC7138.01). Na TFDA com MB, NMBN, S137 e TBO na presença de 15 J cm^{-2} , os microconídios dos isolados clínicos e controle ATCC foram inativados (figura 13).

Figura 13: Avaliação *in vitro* da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) contra os isolados clínicos de *Fusarium* sp. UFC, unidade formadora de colônia; Controle, conídios em PBS (pH 7,4); “escuro”, conídios com ou sem FS no incubado no escuro; Luz, conídios com ou sem FS incubado em 15 J cm⁻². Fonte: Autoria própria (Paziani et al., 2019).

4.7 - Avaliação da toxicidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com fotossensibilizadores fenotiazínicos em *G. mellonella*

A toxicidade da TFDA com os FSs fenotiazínicos MB, NMBN e S137 foram avaliados no modelo experimental alternativo *G. mellonella*. Como resultado foi observado que a exposição somente à luz (15 J cm⁻²) não afetou a sobrevivência das larvas de *G. mellonella*. Da mesma forma, o FS NMBN nas concentrações 100, 200 e 400 µM no escuro e na TFDA (15 J cm⁻²), não afetou a vida e desenvolvimento da larva. O FS S137 nas concentrações 100, 200 e 400 µM não matou nenhuma larva no escuro. Por outro lado, na presença da luz (15 J cm⁻²) o FS S137 nas concentrações 100, 200 e 400 µM matou, respectivamente, 20%, 20% e 10%, das larvas. Já o MB matou apenas 10% das

larvas nas concentrações 750 e 1500 μM (escuro e 15 J cm^{-2}). Entretanto, a TFDA com MB na concentração de 3000 μM matou 50% das larvas em 8 dias de experimento (figura 13). Portanto, a TFDA (15 J cm^{-2}) com os FSs fenotiazínicos MB, NMBN e S137 nas concentrações de 1500 μM , 200 μM e 200 μM , respectivamente, não apresentaram toxicidades para as larvas de *G. mellonella* e podem ser usadas no tratamento de fusariose neste trabalho (figura 14).

Figura 14: Avaliação da toxicidade *in vivo* da TFDA com os FS fenotiazínicos no modelo *Galleria mellonella*. MB, azul de metileno; NMBN, novo azul de metileno N; S137, derivado pentacíclico do MB; PBS, tampão fosfato salino; L-, escuro; L+, 15 J cm^{-2} ; FS, fotossensibilizador; 1 $\times$, MB (750 μM), NMBN e S137 (100 μM); 1 $\times$, 750 μM (MB) e 100 μM (NMBN e S137); 2 $\times$, 1500 μM (MB) e 200 μM (NMBN e S137); 3 $\times$, 2250 μM (MB) e 300 μM (NMBN e S137). Fonte: autoria própria (Paziani et al., 2019).

4.8 – Ensaio de virulência *in vivo* dos isolados clínicos de *Fusarium* sp. em *Galleria mellonella*

4.8.1 - Virulência dos isolados clínicos em relação a capacidade de formação de biofilme

A fim de avaliar o perfil de virulência dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. a partir da capacidade de formação de biofilme, foi adotada a estratégia de infecção artificial em modelo *in vivo* *Galleria mellonella* (figura 15). Para tanto, selecionou-se isolados clínicos para cada espécie de *Fusarium*, cujos perfis foram determinados como maior e menor formador de biofilme (figura 12). Neste trabalho, tais características foram atribuídas a cada isolado clínico a partir de experimentos de quantificação da biomassa e matriz extracelular, pelos métodos cristal violeta e safranina, respectivamente.

Como resultado, foi observado que o isolado clínicos de *F. keratoplasticum* que apresenta maior capacidade para formação de biofilme (LMC7129.01) se mostra altamente virulento, em comparação com a linhagem controle *F. keratoplasticum* e demais isolados clínicos da mesma espécie ($P < 0,05$) (figura 15 a). Adicionalmente, os isolados clínicos de *F. keratoplasticum* que apresentaram baixa formação de biofilme (LMC 7119.01; LMC7133.01; LMC7134.01) apresentaram perfis de virulências atenuadas, em relação a linhagem controle *F. keratoplasticum* e demais isolados clínicos ($P < 0,05$).

O isolado clínico de *F. falciforme* com maior capacidade para formação de biofilme (LMC7210.01) e *F. delphinoides* (LMC7215.01) apresentaram maior virulência, em relação a linhagem controle *F. keratoplasticum* e aos demais isolados clínicos, respectivamente ($P < 0,05$) (figura 15 c e g). Os isolados clínicos da espécie *F. falciforme* que apresentaram baixa formação de biofilme (LMC7102.01, LMC7177.01 e LMC7112.01) apresentaram perfis de virulências atenuadas ($P < 0,05$) (figura 15 c).

Os isolados clínicos de *F. solani* que apresentaram maior produção de biofilme (LMC7182.01) e menor produção de biofilme (LMC 7144.01, LMC7157.01; LMC7181.01) apresentaram altos perfis de virulência, em relação a linhagem controle *F. keratoplasticum* ATCC ($P > 0,05$) (figura 15 b). *F. proliferatum* (LMC7138.01) apresenta baixo perfil de formação de biofilme e alto perfil de virulência (figura 15 f).

Os isolados clínicos de *F. oxysporum* (LMC7117.01; LMC7124.01) e *F. petrophilum* (LMC7168.01; LMC7162.02) apresentam relação direta e estatisticamente significativas de baixa virulência em modelo *G. mellonella* ($P < 0,05$) e em relação a linhagem controle *F. oxysporum* ATCC 40144 e *F. keratoplasticum* ATCC 40099, respectivamente (figura 16 d, f).

Figura 15: Virulência em *G. mellonella* dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. em relação a formação de biofilme. (+), maior formador de biofilme em relação a (-), (-) menor formador de biofilme em relação a (+); ATCC FSSC, *F. keratoplasticum* (ATCC 36031); ATCC FOSC, *F. oxysporum* (ATCC 40144); PBS, controle negativo. Fonte: autoria própria.

5.8.2 –Virulência dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. em relação aos diferentes sítios anatômicos

A virulência dos isolados clínicos de *Fusarium* sp. foi avaliada quanto ao sítio anatômico da infecção fúngica. Portanto, selecionou-se isolados clínicos das espécies mais prevalentes neste estudo, *F. keratoplasticum* e *F. solani*, e que fossem representativas de fusarioses sistêmicas e de micoses superficiais.

Como resultado, foi observado que os isolados clínicos de *F. solani* associados a micose superficial (LMC7182.01, LMC8181.01) e a micose sistêmica (LMC7157.01; 7182.01; LMC7181.01 e LMC7144.01) não apresentaram relação direta e estatisticamente significativa ($P > 0,05$) quando comparadas com os potenciais de virulências. Assim, todos os isolados clínicos de *F. solani* apresentam elevada virulência em comparação com a linhagem controle ATCC, matando de 70% a 100% dos hospedeiros invertebrados em um período de 24 a 72 horas (figura 16 e 17). Como resultado para *F. keratoplasticum*, o isolado clínico proveniente de infecção das vias hematogênicas (LMC7158.01) é capaz de matar 100% dos hospedeiros invertebrados em até 24 horas (figura 17). Enquanto os demais isolados de onicomicose (LMC7146.01) e de dermatomicose (LMC7204.01), apresentam virulência atenuada, quando comparadas com a linhagem ATCC, matando apenas 20% e 30% das larvas, respectivamente (figura 17).

Figura 16: Larvas de *G. mellonella* no sexto instar de desenvolvimento após 24 horas de experimento. A. larva controle negativo (PBS 1X pH 7,4) (vista dorsal e ventral); B. larva infectada com 1×10^6 microconídios/mL em PBS 1X pH 7,4 (vista dorsal e ventral). *, lesão cutânea causada pela fusariose sistêmica. Fonte: autoria própria.

Figura 17: Virulência dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. em larvas de *G. mellonella* em relação ao sítio anatômico de coleta. ATCC FSSC, *F. keratoplasticum* ATCC 40099. Fonte: autoria própria.

5.8.3 - Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em *G. mellonella* infectada com isolados clínicos de *Fusarium* spp.

O efeito da TFDA com MB, NMBN e S137 foi avaliado em larvas de *G. mellonella* infectadas com 1×10^4 microconídios de *F. keratoplasticum* ATCC o qual é capaz de matar até 100% das larvas em um período experimental de sete dias após a injeção artificial (Paziani et al., 2019). A inoculação dos FSs MB (1500 μ M), NMBN (200 μ M) e S137 (200 μ M) não impediu a morte da maioria das larvas infectadas simultaneamente com microconídios de *F. keratoplasticum*. Por outro lado, a sobrevivência das larvas infectadas com *F. keratoplasticum* na TFDA (15 J cm⁻²) foi de 60, 20 e 40% com os FSs MB (750 μ M), NMBN (100 μ M) e S137 (100 μ M), respectivamente. Portanto, houve um aumento da sobrevivência das larvas infectadas e tratadas com TFDA, quando as concentrações de FS aumentaram em 2X. Assim sendo, 1500 μ M (MB), 200 μ M

(NMBN) e 200 μM (S137) (figura 18). A TFDA com o FS S137 foi o mais efetiva, em relação aos demais FSs avaliados neste modelo.

Figura 18: Avaliação da TFDA em *Galleria mellonella* infectada com *F. keratoplasticum*. MB, azul de metileno; NMBN, novo azul de metileno N; S137, derivado pentacíclico de MB; PBS, tampão fosfato salino; L-, escuro; L+, 15 J cm^{-2} ; Fk, *F. keratoplasticum*; 1 x, MB (750 μM), NMBN e S137 (100 μM); 1 x, 750 μM (MB) e 100 μM (NMBN e S137); 2 x, 1500 μM (MB) e 200 μM (NMBN e S137). Fonte: autoria própria (Paziani e colaboradores, 2019).

5.8.4 – Validação da TFDA *in vivo* por *fungal burden*

A validação da inativação dos microconídios de *F. keratoplasticum* ATCC 40099 após a TFDA com MB, NMBN e S137 em *G. mellonella* infectada foi realizada pela técnica que determina a carga fúngica (*Fungal burden*). Esta metodologia é dada a partir do cultivo de diluições da hemolinfa da larva infectada pelo fungo e em relação às terapias e respectivos controles no escuro (figura 19).

Como resultado, não houve a inviabilização dos microconídios de *F. keratoplasticum* quando as larvas foram apenas expostas apenas à luz (15 J cm^{-2}) ou quando foram apenas tratadas com os FSs MB (1500 μM), NMBN (200 μM) e S137 (200 μM) no escuro (figura 19). Quando as larvas infectadas com microconídios de *F. keratoplasticum* ATCC 40099 foram submetidas à TFDA (15 J cm^{-2}), houve uma redução da viabilidade dos microconídios na hemolinfa de 110 UFC/larva no escuro para, em média, 38, 57 e 2 UFC/larva com a TFDA com

MB, NMBN e S137, respectivamente (figura 19). Estes resultados indicam que a TFDA com estes FSs fenotiazínicos no modelo *in vivo* *G. mellonella* é capaz de reduzir a viabilidade de microconídios de *F. keratoplasticum* ATCC 40099 (figura 19).

Figura 19: *Fungal burden* da hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com microconídios de *F. keratoplasticum* ATCC 40099 e tratadas com TFDA. MB, azul de metileno; NMBN, novo azul de metileno N; S137; PBS, tampão fosfato salino; L-, escuro; L+, 15 J cm⁻². UFC, unidade formadora de colônia. Fonte: autoria própria.

5.8.5 – A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e os hemócitos circulantes na hemolinfa das larvas de *G. mellonella*

A fim de analisar o impacto da TFDA no perfil de hemócitos circulantes na hemolinfa das larvas de *G. mellonella*, avaliou-se a contagem total de hemócitos (CTH) circulantes em larvas *naïves*, infectadas por *F. keratoplasticum* INCQS 40099 (ATCC 36031) e submetidas à TFDA.

Como resultado, observou-se que os hemócitos presentes nas contagens totais pertencem a cinco tipos celulares específicos da resposta imune larval. As características celulares são sugestivas para: plasmócito alongado ou lamelócito, plasmatócito, granulócito, oenocitóide e esferulócito (figura 20). Adicionalmente, foi observado que inóculos de PBS (pH 7,4) estimulam a produção de hemócitos de 138 CTH/μL para 250 CTH/μL nas larvas *naïve* e PBS, respectivamente. As hemolinfas provenientes das larvas que receberam inóculos de microconídios de *F. keratoplasticum* apresentaram a contagem média de 170 CTH/μL e 70 CTH/μL quando no escuro e exposta à luz, respectivamente, mostrando que a presença do fungo, em ambas as condições, reduz a contagem total de hemócitos (figura 21).

Quando as larvas foram submetidas aos FSs no escuro, porém sem fungo, mostrou os valores médios de 153 CTH/ μ L, 146 CTH/ μ L e 250 CTH/ μ L para MB, NMBN e S137, respectivamente. Já com a presença do fungo e ainda no escuro, foi observado os valores 174 CTH/ μ L, 155 CTH/ μ L e 120 CTH/ μ L para MB, NMBN e S137, respectivamente. Quando as larvas foram submetidas aos FSs no claro, porém sem fungo, mostrou os valores médios de 224 CTH/ μ L, 325 CTH/ μ L e 423 CTH/ μ L para MB, NMBN e S137. Enquanto que na TFDA foram observados os valores médios de 274 CTH/ μ L, 15 CTH/ μ L e 210 CTH/ μ L para MB, NMBN e S137, respectivamente (figura 21).

Assim, os resultados sugerem que a TFDA estimula a produção de células para a resposta imune em *G. mellonella*. Independentemente da presença ou não de infecção por *Fusarium* spp., a atividade total da TFDA com MB e S137 aumenta a CTH nas hemolinfas (figura 21) e a TFDA com NMBN na presença de *Fusarium* sp. apresenta significativa redução de hemócitos circulantes para uma média de 140 CTH/ μ L.

Figura 20: Características das células da resposta imune de *G. mellonella*. A e B: Plasmatócito (pl); C e D: Plasmatócito alongado (pl) ou lamelócito (lm); E e F: granulócito (gr); G e H: Esferulócito (sp); I e J: Oenocitóide (oe). Corado com panótico rápido Laborclin® e analisado por microscopia óptica (400x, Observer Z 1 - Carl Zeiss Jena, Alemanha), Barra de escala= 5 μ m. Fonte: Vanessa Fávaro Braga (2018).

Figura 21: Contagem total dos hemócitos da hemolinfa de larvas de *G. mellonella*. MB, azul de metileno; NMBN, novo azul de metileno N; S137, derivado pentacíclico do MB; PBS, tampão fosfato salino; L-, escuro; L+, 15 J cm⁻²; *Naïve*, larva não manipulada. Fonte: autoria própria (Paziani e colaboradores, 2020).

6. Discussão

Fusarium é um gênero fúngico amplo, diverso e com importância agrícola, econômica e médica. As espécies desse gênero são produtoras de micotoxinas e são patógenos para plantas, humanos e demais animais (RAGASA et al., 2021). Nas últimas décadas houve um aumento notável na incidência de infecções por fungos e, além disso, as espécies do gênero *Fusarium* são a segunda maior causa de infecções disseminadas em humanos causadas por fungos filamentosos, ficando atrás somente de *Aspergillus fumigatus*. São urgentes os estudos com *Fusarium* spp., uma vez que o prognóstico de mortalidade da fusariose disseminada é de 80% (AL-HATMI et al., 2016) dado à resistência intrínseca aos antifúngicos, característico das espécies deste gênero fúngico (BATISTA et al., 2020a).

Neste estudo foram avaliados 108 isolados clínicos de *Fusarium* spp. originados de episódios de infecções fúngicas no Estado de São Paulo. Os isolados clínicos foram inicialmente identificados por método clássico como *Fusarium* sp. Para todos os 108 isolados clínicos foram observadas a macro e micromorfológicas característica ao gênero *Fusarium*. Foi possível distinguir morfologicamente 9 isolados clínicos como pertencentes ao FOSC dado a sua coloração característica em meio de cultivo (TEIXEIRA; COELHO; TEBALDI, 2017) (figura 6). Entretanto, o método clássico de identificação de fungos apresenta restrições quanto a identificação de espécies, subespécies e as espécies crípticas dos complexos de espécie de *Fusarium*. Assim, métodos moleculares são empregados para a correta identificação e melhor compreensão da epidemiologia dessas infecções (BOUTIGNY et al., 2019).

As identificações e estudos filogenéticos de cepas provenientes de casos clínicos de infecções fúngicas são realizadas pelo sequenciamento da região ITS do rDNA (O'DONNELL et al., 2018; SUGAWARA et al., 2013). Neste trabalho, o sequenciamento da região ITS do rDNA identificou a maioria dos isolados clínicos como pertencentes ao FSSC, seguido do FOSC, FDSC e FFSC. Além disso, ainda neste trabalho, também foi realizado o sequenciamento do gene EF1 α que fornece uma abordagem mais robusta para a identificação das espécies de *Fusarium* (LIRA et al., 2019). Deste modo, foram identificadas as espécies *F. keratoplasticum*, *F. solani*, *F. falciforme* e *F. petroliphilum* do FSSC; *F. oxysporum* do FOSC; *F. proliferatum* do FFSC; e *F. delphinoides* do FDSC.

Em uma análise global, entre 1958 e 2015, foi constatado que o gênero *Fusarium* é diverso e apresenta a prevalência de três espécies causadoras de infecção em humanos, são elas: *F. falciforme*, *F. keratoplasticum* e *F. solani* (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016; HERKERT et al., 2019). Estudos acerca da prevalência de espécies de *Fusarium* nas cidades de Curitiba e Rio de Janeiro, apontam a maior incidência de micoses superficiais por *Fusarium* sp., sendo FSSC mais prevalentes, seguido de FOSC (HERKERT et al., 2019). Um perfil similar de prevalência foi observado nos Estados Unidos, onde 85% dos isolados clínicos do gênero *Fusarium* foram identificados por métodos moleculares como pertencentes ao FSSC, seguido de FOSC (GUARRO, 2013). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos neste estudo de isolados clínicos de paciente do Estado de São Paulo, onde FSSC apresentou maior prevalência, tanto em micoses superficiais, quanto em isolados provenientes de amostras de sangue e líquido peritoneal. Entre as espécies mais prevalentes do FSSC, no presente estudo, destacam-se na ordem decrescente *F. keratoplasticum*, *F. solani* e *F. falciforme*.

Curiosamente, estudos realizados em Medellín e Bogotá, Colômbia, evidenciam que FSSC é o segundo mais prevalente nos casos de micoses superficiais. Ficando atrás apenas de FOSC, sendo este o complexo de espécies mais prevalente naquele país (GUEVARA-SUAREZ et al., 2016). Os mesmos autores apontam que as prevalências de espécies em casos clínicos variam a cada localidade, pois, o mesmo perfil de prevalência de *Fusarium* encontrado na Colômbia, também é visto em países como Suíça e Israel (NINET et al., 2005; NIR-PAZ et al., 2004).

Outros métodos são empregados com o intuito de otimizar o tempo de identificação de fungos patogênicos. O método fenotípico MALDI-TOF MS é utilizado na identificação de proteínas e peptídeos, na taxonomia de microrganismos, entre inúmeras outras aplicações. É um método de identificação rápido e baseado em padrões espectrais. Neste estudo, comparamos a identificação molecular dos isolados clínicos com os resultados obtidos pelo método fenotípico MALDI-TOF MS. Observou-se que, por meio da técnica MALDI-TOF MS, foi possível identificar 94,4% dos isolados clínicos nos complexos de espécie de *Fusarium*. O método MALDI-TOF MS para identificação de espécies apresenta um limitado número de informações nos bancos de dados espectrais disponíveis (PACKEU et al., 2013; REEVE;

STEWART; RYAN, 2019), o que justifica a não identificação de seis isolados clínicos deste trabalho e sugere que mais estudos devem ser realizados neste sentido para enriquecer os bancos de dados de espectros de massas.

Estudos colaborativos realizados na Suíça, Suécia, Dinamarca, Bélgica e Espanha mostram que MALDI-TOF MS, por meio do acesso ao banco de dados Bruker MBT, foi capaz de identificar 61% de *Fusarium* clínicos em complexo de espécie, quando comparado com a identificação molecular (ITS e EF1 α). Os mesmos autores apontam que os bancos de dados espectrais MSI-1 e MSI-2 aumentam a possibilidade de correta identificação de isolados clínicos de *Fusarium* spp. em 91% e 98% em complexo de espécie, respectivamente (NORMAND et al., 2021). Ainda, Normand e colaboradores (2021) ressaltam que o MALDI-TOF MS não identificou mais que 50% dos isolados clínicos em espécies, independente do banco de dados utilizado. Deste modo, os esforços na geração de espectros de cepas específicas e o enriquecimento de bancos de dados para espécies de *Fusarium* são importantes para a aplicação da referida metodologia na rotina diária de identificação de fungos patogênicos (RIZZATO et al., 2015; RYCHERT et al., 2018; WICKES; WIEDERHOLD, 2018).

Para a identificação de microrganismos, MALDI-TOF MS detecta, simultaneamente, uma grande quantidade de moléculas, como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. Devemos considerar que cada complexo de espécies de *Fusarium* é composto por diversas espécies que, por sua vez, geram espectros de massas característicos para cada espécie (PENG et al., 2019). Neste trabalho, 5 e 3 diferentes perfis de espectro de massas foram identificados para os isolados clínicos do FSSC e FOSC, respectivamente. Sabe-se que os perfis espectrais de massas são alterados com as variações ambientais, as quais alteram as vias metabólicas e reorganizam os mecanismos biossintéticos (GEISER et al., 2004; LÓPEZ-MAURY; MARGUERAT; BÄHLER, 2008). Assim, é muito importante ressaltar a padronização deste procedimento para a identificação de microrganismos, uma vez que os fungos apresentam alta plasticidade de regulação e expressão de genes que, por sua vez, alteram os padrões de massas espectrais obtidas nos resultados de MALDI-TOF MS (GEISER et al., 2004; LÓPEZ-MAURY; MARGUERAT; BÄHLER, 2008; RIZZATO et al., 2015; RYCHERT et al., 2018; WICKES; WIEDERHOLD, 2018).

As espécies do gênero *Fusarium* frequentemente causam onicomicose, afetando as porções subungueal, distal e lateral da unha. Esta

doença tem uma distribuição cosmopolita, incluindo regiões de clima desértico (GHARIB; ABDULLAH, 2020; SUGIURA et al., 2014). Em nosso trabalho, 66,7% dos isolados clínicos são provenientes de unhas dos pés e 4,2% de unhas das mãos. Entre eles, a maior incidência foi da espécie *F. keratoplasticum*, seguido de *F. solani*, *F. falciforme*, *F. oxysporum* e *F. proliferatum*. Sendo as três primeiras do complexo de espécie *F. solani*.

De acordo com a literatura, as espécies mais comuns de *Fusarium* em casos de onicomicoses, são: *F. solani* (FSSC, 50%), *F. oxysporum* (FOSC, 14%), *F. verticillioides* (FFSC, 11%) e *F. moniliforme* (FFSC, 10%) (DIONGUE et al., 2017). FOSC é isolado com maior frequência em unhas de pé, enquanto FSSC apresenta maior frequência em unhas de mão (CHABASSE; PIHET, 2014a, 2014b). Curiosamente, no presente estudo, FSSC, FOSC e FFSC, apresentaram maior prevalência de isolados provenientes de casos de infecções em unhas de pé. Para casos de infecções em unhas de mão, neste estudo, FSSC e FOSC apresentaram apenas 8,8% e 11,1% do total de isolados clínicos, respectivamente.

Devido ao crescente número de infecções em paciente imunocomprometidos e a rápida adaptação em situações adversas, *Fusarium* spp. vem ganhando atenção da comunidade científica. Portanto, além de onicomicoses, *Fusarium* spp. causa infecções de pele, sendo crescente a incidência destas lesões infecciosas superficiais. Há correlação entre lesões por maceração da pele (intertrigo interdigital) e fusarioses invasivas. Essa relação de micoses superficiais como via para micoses sistêmicas se torna preocupante durante a neutropenia (BATISTA et al., 2020b; VARON et al., 2014). Portanto, a pele tem uma relação direta com casos de fusarioses invasivas, pois é considerada o local primário para o contato com o fungo (ANAISSE; NUCCI, 2002). Em nosso trabalho, as espécies mais prevalentes em micoses de pele foram *F. keratoplasticum*, seguida de *F. solani* e *F. petroliphilum*. Esses resultados vão ao encontro dos dados levantados em um estudo realizado no Estado do Rio de Janeiro com isolados clínicos de *Fusarium* sp. em micoses superficiais, onde as espécies mais prevalentes foram *F. keratoplasticum* e *F. petroliphilum* (HERKERT et al., 2019; O'DONNELL et al., 2007).

Não obstante, as manipulações e manutenções incorretas em lentes de contato são também associadas à severas lesões de córneas. Tais lesões podem levar a infecções fúngicas disseminadas, dependendo do status imune

do paciente e da capacidade de aderência dos fungos (CÓRDOVA-ALCÁNTARA et al., 2019). Além disso, fatores preexistentes podem estar envolvidos em casos de ceratites, como: trauma de córnea, o uso indiscriminado de colírios com corticoides, lesões causadas pelos vírus do herpes simples, diabetes mellitus e outros fatores de imunossupressão (CUNHA et al., 2020). Em países de clima tropical, como Índia e Nepal, a taxa de micoses em córnea chega a 50% (MAHMOUDI et al., 2018). Muito embora a Europa tenha taxas inferiores, observa-se um aumento alarmante em casos de ceratites no Reino Unido nos últimos anos (NOWIK et al., 2020). Para Cunha e colaboradores (2020), espécies de *Fusarium* são as mais frequentes em casos de ceratites na Europa. Estudos apontam espécies de FSSC como as mais prevalentes em casos de ceratite e, ainda, apresentam importantes níveis de resistências aos tratamentos disponíveis para oftalmologia (TROVATO et al., 2021). Em nosso estudo, os isolados mais prevalentes para micoses invasivas também pertencem ao FSSC (*F. solani*, *F. keratoplasticum* e *F. petrophilum*).

Os tratamentos de infecções fúngicas disseminadas são desafiadores e as recomendações são do uso da anfotericina B e voriconazol (HERKERT et al., 2019; MCCARTHY et al., 2017; O'DONNELL et al., 2008; SANGUINETTI; POSTERARO, 2018; TAJ-ALDEEN et al., 2019). As onicomioses e dermatomioses são tratadas com terbinafina, voriconazol e itraconazol (AL-HATMI et al., 2018a). Além desses fármacos, estudos destacam o sucesso no tratamento de onicomioses causadas por FSSC e FOSC com esmalte de ciclopirox olamina (RAMMLAIR; MÜHLETHALER; HANEKE, 2019). Por outro lado, os mesmos autores relatam o baixo resultado no tratamento tópico com terbinafina, para a mesma enfermidade. A terbinafina é um medicamento antifúngico da classe alilamina e que atua como um inibidor da esqualeno epoxidase, a enzima fundamental na cascata da biossíntese de ergosterol. Este fármaco é frequentemente escolhido para o tratamento da dermatofitose (ROBERTS; TAYLOR; BOYLE, 2003; SALEHI; SHAMS-GHAHFAROKHI; RAZZAGHI-ABYANEH, 2018). Os antifúngicos da classe dos azóis são os mais usados no combate a micoses e também muito utilizados na agricultura contra as espécies de *Fusarium* fitopatogênicas (FAN et al., 2013).

É importante ressaltar que, por falta de análises dos perfis epidemiológicos e clínicos para algumas espécies de *Fusarium* e por não haver estudos acerca de mecanismos moleculares para resistências aos

antimicrobianos, não há *breakpoints* estabelecidos para o referido gênero. Neste caso, aplica-se, o *epidemiological cutoff values* (ECVs) que é baseado nas CIMs obtidas pela aplicação do protocolo CLSI M38-A2 (ESPINEL-INGROFF et al., 2016). Os ECVs foram obtidos com base em 17 estudos independentes e de amplitude global para FSSC, FOSC e FIESC. Assim, é possível rastrear isolados selvagens (que não apresentam tendências evidentes para resistência) e os isolados não selvagens (ESPINEL-INGROFF et al., 2011; TORTORANO et al., 2014). Tais valores estão acima do que é considerado *breakpoint* de isolados selvagens para outros gêneros de fungos filamentosos (ESPINEL-INGROFF et al., 2016), o qual indica uma possível necessidade de altas concentrações do antifúngico para o tratamento. Os valores de anfotericina B encontrado neste trabalho (1,6 – 4,0 µg/mL) estão abaixo do valor da CIM do ECV determinado no referido estudo, indicando que as linhagens deste estudo apresentam perfis selvagens para a anfotericina B.

Neste estudo, os valores de ECV encontrados para itraconazol mostram que a maioria dos isolados clínicos de *Fusarium* spp. apresentam perfil não selvagem para este fármaco. Espinel-Ingroff e colaboradores (2016) também apontam o perfil não selvagem para isolados de *Fusarium*, quando expostos à itraconazol. Os valores altos de ECVs para azóis estão além dos níveis máximos esperados. Destacando, portanto, a natureza de resistência intrínseca de *Fusarium* para a referida classe de antifúngicos (ESPINEL-INGROFF et al., 2016).

O aumento da resistência aos antifúngicos pode estar associado ao aumento do potencial de formação de biofilme. O biofilme é um importante fator de virulência, em que o fungo se adere a superfícies bióticas e abióticas, desenvolvendo-se em comunidades altamente organizadas e embebidas em uma matriz exopolimérica (COSTA-ORLANDI et al., 2014). Para os mesmos autores, tal estrutura tem potencial para proteger os patógenos de quaisquer condições adversas ambientais.

Nos últimos anos, os estudos sobre biofilmes de fungos filamentosos aumentaram consideravelmente, pois as infecções associadas às formações de biofilmes são reconhecidas como um problema clínico alarmante (CHANDRA et al., 2001; LÓPEZ-RIBOT, 2005). As espécies de *Fusarium* que apresentam alta formação de biofilme são diretamente relacionadas ao difícil tratamento (PEIQIAN et al., 2014; SAV et al., 2018). Espécies de *F. solani* apresentam alta

capacidade de formar biofilme e são associadas à ceratite e demais doenças invasivas (MUKHERJEE et al., 2012; PEIQIAN et al., 2014). Além disso, biofilmes contendo *Fusarium* podem ser encontrados em encanamentos hospitalares, fazendo desse gênero um risco para infecções nosocomiais em neutropênicos (PEIQIAN et al., 2014; SAV et al., 2018). Neste estudo, a maioria dos isolados clínicos de FSSC se destaca por apresentar alta formação de biofilme. Por outro lado, os isolados clínicos de FOSC, FFSC e FDSC mostraram baixa capacidade ou, até mesmo, ausência da formação de biofilme. A aderência do fungo em superfícies bióticas ou abióticas representa um processo fundamental para colonização, ativação de bombas de efluxo, mudança de sítios de ligações de fármacos, barreira contra células do sistema imunológico e barreira contra a ação dos antifúngicos usados na terapia para fusarioses. Portanto, a alta capacidade de formação de biofilme está diretamente relacionada ao potencial de infecções (CÓRDOVA-ALCÁNTARA et al., 2019; PIERCE et al., 2017). Esses dados corroboram com a diferença de incidência e prevalência de fusarioses entre FSSC e FOSC, que são responsáveis por, aproximadamente, 60% e 20% das doenças em humanos, respectivamente (GUARRO, 2013).

Para a investigação da virulência de *Fusarium*, estudos apontam a relevância do inseto *G. mellonella* (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2016) devido a rapidez na obtenção dos resultados, economia e ausência de aprovação por conselho em bioética. Este modelo vem sendo usado cada vez mais em diferentes investigações de virulência de cepas e toxicidade de compostos (SHEEHAN; KAVANAGH, 2018). Além disso, a resposta imune de insetos apresenta muitas semelhanças estruturais e funcionais com a resposta imune inata de mamíferos (fagocitose, produção de superóxido, coagulação e melanização) (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013b; KAVANAGH; SHEEHAN, 2018; WU; XU; YI, 2016). Trabalhos evidenciam, ainda, a forte correlação e tendências de curvas similares entre os modelos murino imunossuprimido e *G. mellonella* (CHAMILOS et al., 2007; KAVANAGH; SHEEHAN, 2018; WANG et al., 2013).

Neste estudo, determinou-se que a virulência de *F. keratoplasticum* no modelo *G. mellonella* é dependente da concentração do inóculo conidial. Em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, a virulência de *Fusarium* sp. em *G. mellonella* é claramente dependente de múltiplos fatores, bem como: tipo de

linhagem testada, temperatura e citomorfologia do conídio. Espécies de FSSC apresentam características favoráveis à maior virulência, em comparação com outras espécies do gênero (MARINACH-PATRICE et al., 2009; MUHAMMED et al., 2013).

Esses dados corroboram com os resultados obtidos nesse trabalho para *F. keratoplasticum*, que apresenta maior virulência, quando comparado com as demais cepas. Ainda para *F. keratoplasticum*, notou-se, maior virulência em isolados provenientes de amostras de sangue, em relação aos provenientes de micoses superficiais. Não houve correlação dos perfis de virulências de *F. solani* com os diversos sítios anatômicos, dos quais as cepas foram isoladas. Ainda, não se observou quaisquer perfis de correção entre cepas maiores formadoras de biofilme, em relação à maior virulência *in vivo*.

Como discutido, os isolados clínicos deste trabalho apresentam perfis não selvagens para os azóis, o que indica a emergência de cepas que apresentam dificuldade de tratamento com os antifúngicos convencionais. Assim, faz-se necessário buscar vias alternativas de tratamento de infecções causadas por este patógeno. A TFDA é uma promissora alternativa no tratamento de infecções fúngicas que, por sua vez, altera as biomoléculas da célula do patógeno, devido a sua capacidade de produção de EROs (DAI et al., 2012). Esta terapia demonstra ser efetiva no controle e tratamento de infecções causadas por diversos microrganismos (BALTAZAR et al., 2015). Espécies de *Fusarium* são inativadas pela TFDA, usando os FSs fenotiazínicos MB, NMBN, TBO e S137 (DE MENEZES et al., 2016). A inativação ocorre pela presença de uma ERO denominada de oxigênio singleto, que causa danos na membrana celular e peroxidação nos lipídios da célula fúngica, além de danos a proteínas e DNA. Ainda, a TFDA com MB foi utilizada com sucesso no tratamento de úlceras de pele causadas por *Fusarium* sp. (ASPIROZ et al., 2017; DE MENEZES et al., 2016).

Neste estudo, a TFDA com MB, NMBN e S137 foram efetivas no tratamento de fusarioses no modelo alternativo *in vivo* *G. mellonella*. O composto não comercial, S137, não demonstrou toxicidade na dose efetiva utilizada na TFDA. Além disso, este mostrou ser um excelente FS na inativação de isolados clínicos de *Fusarium* sp.

Menezes e colaboradores (2016) comprovaram a eficácia da TFDA usando MB, NMBN, S137 e TBO em microconídios de *F. keratoplasticum* ATCC,

F. moniliforme ATCC e *F. oxysporum* ATCC. Os mesmos autores relacionaram a TFDA à oxidação lipídica e permeabilidade de membrana no patógeno. Resultados similares foram observados com a fotoinativação de *Candida albicans*, porém em modelo *in vivo* *G. mellonella*. A TFDA foi capaz de inativar as leveduras presentes na hemolinfa, imediatamente após a exposição à luz (CHIBEJE JUNIOR et al., 2013). Neste presente estudo, encontrou-se resultados similares, quando os microconídios de *F. keratoplasticum* e *F. solani* foram recuperados da hemolinfa de *G. mellonella*, previamente infectadas e submetidas a TFDA. Constatou-se que TFDA com MB, NMBN e S137 foram capazes de inativar significativamente os patógenos em modelo *in vivo*.

Um fator importante a ser considerado para a sobrevivência de um organismo complexo é a resposta do seu sistema imunológico frente a uma invasão por fungos. No modelo *G. mellonella*, as alterações na densidade de hemócitos circulantes na hemolinfa são diretamente proporcionais à patogenicidade fúngica (MIKULAK et al., 2018). A resposta imune celular (hemócitos circulantes) das larvas de *G. mellonella* infectadas com os microconídios do isolado clínico *F. keratoplasticum* diminuiu, o qual correlaciona-se com a baixa sobrevivência larval. Avaliou-se, ainda, o efeito da TFDA na contagem total de hemócitos circulantes de larvas de *G. mellonella* não infectadas e infectadas por *F. keratoplasticum*.

Assim, neste estudo, a contagem total de hemócitos aumentou após a TFDA com MB, NMBN e S137, enquanto a carga de fungos diminuiu. Resultados semelhantes foram encontrados em TFDA com MB contra *Porphyromonas gingivalis* (DOS SANTOS et al., 2017) e *C. albicans* (CHIBEJE JUNIOR et al., 2013). O aumento da resposta imune celular, neste trabalho, está correlacionado com o aumento da sobrevivência de larvas e na diminuição da carga de fungos viáveis, recuperados da hemolinfa. Assim, sugere-se que os hospedeiros invertebrados infectados sobreviveram, pois, a resposta do sistema imunológico celular de *G. mellonella* agiu com eficácia e concomitante contra as células fúngicas que foram danificadas pela TFDA.

7. Conclusão

A identificação clássica para isolados clínicos de *Fusarium* spp. não é capaz de distingui-los entre os diversos complexos de espécies, o que pode causar falhas na correta identificação e, por consequência, no tratamento antifúngico.

O sequenciamento da região ITS identifica os isolados clínicos nos complexos de espécie de *Fusarium*, enquanto que o gene EF1 α identifica as espécies.

MALDI-TOF MS mostrou-se eficiente na identificação da maioria dos isolados clínicos de *Fusarium* em complexo de espécie.

FSSC é a mais abundante entre os isolados clínicos do gênero *Fusarium* neste estudo, seguido por FOSC.

F. solani e *F. keratoplasticum* se destacam pela maior prevalência em casos de micoses sistêmicas, entre os isolados do presente estudo.

FSSC apresenta maior formação de biofilme *in vitro* e maior perfil de virulência *in vivo*. Ainda, isolados de *F. keratoplasticum* provenientes do sangue apresentaram maior virulência, em relação aos isolados provenientes de micoses superficiais.

Fármacos como itraconazol mostrou maiores CIM, evidenciando um perfil não-selvagem desse gênero aos azoles.

A TFDA inativa microconídios de isolados clínicos de *Fusarium* spp. com perfil não-selvagem em modelo *in vivo* alternativo *G. mellonella*.

Os FS fenotiazínicos MB, NMBN, TBO e S137 não apresentam toxicidade ao hospedeiro e nas doses avaliadas neste estudo.

A quantidade dos hemócitos circulantes em *G. mellonella* sofre alterações quando larvas são infectadas por isolados clínicos de *Fusarium* spp. e quando são submetidas à TFDA. Além disso, sugere-se que a TFDA estimula a produção e diferenciação de células para a resposta imune do invertebrado.

Referências bibliográficas

A, S. et al. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. **Medical mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. S93–S101, 1 abr. 2018.

AHEARN, D. G.; DOYLE STULTING, R. **Fungi associated with drug recalls and rare disease outbreaks***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*Springer Verlag, , 18 out. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10295-014-1503-7>>. Acesso em: 9 maio. 2021

AL-HATMI, A. M. et al. Global molecular epidemiology and genetic diversity of *Fusarium*, a significant emerging group of human opportunists from 1958 to 2015. **Nature Publishing Group**, v. 5, p. 124, 2016.

AL-HATMI, A. M. S. et al. Current antifungal treatment of fusariosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 326–332, 1 mar. 2018a.

AL-HATMI, A. M. S. et al. Current antifungal treatment of fusariosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 326–332, 1 mar. 2018b.

AL-HATMI, A. M. S.; MEIS, J. F.; DE HOOG, G. S. **Fusarium: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance***PLoS Pathogens*Public Library of Science, , 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005464>>. Acesso em: 9 maio. 2021

AL-MAQTOOFI, M.; THORNTON, C. R. Detection of human pathogenic *Fusarium* species in hospital and communal sink biofilms by using a highly specific monoclonal antibody. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 3620–3634, 1 nov. 2016.

ALSOHAILI, S.; BANI-HASAN, B. M. Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in the Northern Eastern Desert of Jordan. 2018.

AMOS-TAUTUA, B. M.; SONGCA, S. P.; OLUWAFEMI, O. S. **Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy***Molecules*MDPI AG, , 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6650910/>. Acesso em: 9 maio. 2021

ANAISSE, E.; NUCCI, M. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: Implications for diagnosis and management. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 909–920, 15 out. 2002.

ARTEAGA BLANCO, L. A. et al. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell and Tissue Research**, v. 370, n. 1, p. 153–168, 1 out. 2017.

ASPIROZ, C. et al. Terapia fotodinâmica com azul de metileno em úlceras cutâneas infectadas com *Pseudomonas aeruginosa* y *Fusarium* spp. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 108, n. 6, p. e45–e48, jul. 2017.

BALTAZAR, L. M. et al. **Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections***Frontiers in Microbiology*Frontiers Media S.A., , 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25821448/>>. Acesso em: 10 maio. 2021

BATISTA, B. G. et al. **Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, , 2020a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491099/>>. Acesso em: 20 jun. 2021

BATISTA, B. G. et al. **Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, ,

2020b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822020000100250&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 10 maio. 2021

BENITEZ, L. L.; CARVER, P. L. **Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents** Springer International Publishing, , 15 maio 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40265-019-01127-8>>. Acesso em: 9 maio. 2021

BHATIA, A. et al. Efficacy of oral terbinafine versus itraconazole in treatment of dermatophytic infection of skin - A prospective, randomized comparative study. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 51, n. 2, p. 116–119, 1 mar. 2019.

BORGHI, E.; BORGIO, F.; MORACE, G. Fungal biofilms: Update on resistance. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2016. v. 931.

BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E. M. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. **mSphere**, v. 1, n. 4, 31 ago. 2016.

BOUTIGNY, A. L. et al. Metabarcoding targeting the EF1 alpha region to assess fusarium diversity on cereals. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0207988, 1 jan. 2019.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. **An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes** Virulence Taylor and Francis Inc., , 2013a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23921374/>>. Acesso em: 9 maio. 2021

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. **An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes** Virulence Taylor and Francis Inc., , 2013b.

CALVILLO-MEDINA, R. P. et al. Proteome analysis of biofilm produced by a *Fusarium falciforme* keratitis infectious agent. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 232–241, 1 maio 2019.

CALZAVARA-PINTON, P. et al. Invited Review Photodynamic Antifungal Chemotherapy †. [s.d.].

CARLSON-BANNING, K. M. et al. Toward Repurposing Ciclopirox as an Antibiotic against Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 23 jul. 2013.

CHABASSE, D.; PIHET, M. **Les onychomycoses à moisissures** Journal de Mycologie Medicale Elsevier Masson SAS, , 1 dez. 2014a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25458362/>>. Acesso em: 10 maio. 2021

CHABASSE, D.; PIHET, M. **Méthodes de diagnostic d'une onychomycose** Journal de Mycologie Medicale Elsevier Masson SAS, , 1 dez. 2014b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25458363/>>. Acesso em: 10 maio. 2021

CHAMILOS, G. et al. **Role of mini-host models in the study of medically important fungi** Lancet Infectious Diseases Elsevier, , 1 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S1473309906706867/fulltext>>. Acesso em: 9 maio. 2021

CHAMPION, O. L.; WAGLEY, S.; TITBALL, R. W. **Galleria mellonella as a model host for microbiological and toxin research** Virulence Taylor and Francis Inc., , 2 out. 2016. Disponível em: <pmc/articles/PMC5029293/>. Acesso em: 9 maio. 2021

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385–5394, 2001.

CHIBEBE JUNIOR, J. et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. **BMC microbiology**, v. 13, p. 9, 1 out. 2013.

CHIEWCHANVIT, S. et al. Melanization of *Fusarium keratoplasticum* (*F. solani* Species Complex) During Disseminated Fusariosis in a Patient with Acute Leukemia. **Mycopathologia**, v. 182, n. 9–10, p. 879–885, 1 out. 2017.

CHOWDHARY, A. et al. Correction: Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 11, p. e1003633, 14 nov. 2013.

CORDEIRO, R. D. A. et al. Efflux pump inhibition controls growth and enhances antifungal susceptibility of *Fusarium solani* species complex. **Future Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 9–20, 1 jan. 2020.

CÓRDOVA-ALCÁNTARA, I. M. et al. Biofilm characterization of *Fusarium solani* keratitis isolate: increased resistance to antifungals and UV light. **Journal of Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 485–497, 1 jun. 2019.

COSSU, A. et al. Antimicrobial Effect of Photosensitized Rose Bengal on Bacteria and Viruses in Model Wash Water. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 3, p. 441–451, 1 mar. 2016.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719–727, 1 jan. 2014.

CUNHA, A. M. et al. A 10-year retrospective clinical analysis of fungal keratitis in a portuguese tertiary centre. **Clinical Ophthalmology**, v. 14, p. 3833–3839, 2020.

DAI, T. et al. **Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Research Foundation, , 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3322354/>. Acesso em: 9 maio. 2021

DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, p. 5–31, 1 fev. 2017.

DE MENEZES, H. D. et al. In vitro photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1623–1632, mar. 2014.

DE MENEZES, H. D. et al. Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 164, p. 1–12, 1 nov. 2016.

DE OLIVEIRA, C. A. et al. Photoinactivation of different human tumor cell lines and sheep red blood cells in vitro by liposome-bound Zn(II) Phthalocyanine: Effects of cholesterol. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 100, n. 2, p. 92–99, ago. 2010.

DELIA, M. et al. **Fusariosis in a Patient with Acute Myeloid Leukemia: A Case Report and Review of the Literature** *Mycopathologia* Springer Netherlands, , 1 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27008433/>>. Acesso em: 9 maio. 2021

DIONGUE, K. et al. Onychomycosis Caused by *Fusarium* spp. in Dakar, Senegal: Epidemiological, Clinical, and Mycological Study. **Dermatology Research and Practice**, v. 2017, 2017.

DOS SANTOS, J. D. et al. Immunomodulatory effect of photodynamic therapy in *Galleria mellonella* infected with *Porphyromonas gingivalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 507–511, 1 set. 2017.

DOUGHERTY, T. J. et al. **Photodynamic therapy** *Journal of the National Cancer Institute* Oxford University Press, , 17 jun. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9637138/>>. Acesso em: 6 jun. 2021

- DURIEUX, M. F. et al. **Galleria mellonella as a screening tool to study virulence factors of Aspergillus fumigatus** Virulence Bellwether Publishing, Ltd., , 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33682618/>>. Acesso em: 9 maio. 2021
- ESPINEL-INGROFF, A. et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and aspergillus spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5150–5154, nov. 2011.
- ESPINEL-INGROFF, A. et al. International Evaluation of MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Value (ECV) Definitions for Fusarium Species Identified by Molecular Methods for the CLSI Broth Microdilution Method. 2016.
- FAN, J. et al. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of Fusarium graminearum identifies a novel genus-specific CYP51 function. **New Phytologist**, v. 198, n. 3, p. 821–835, 1 abr. 2013.
- FÁVARO BRAGA, V.; PRETO, R. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO Determinação da prevalência das espécies, resistência a antifúngicos e perfil de virulência de Aspergillus spp. oriundos de amostras de origem clínica.** [s.l: s.n.].
- GARCÍA-RUIZ, J. C. et al. Disseminated fusariosis and hematologic malignancies, a still devastating association. Report of three new cases. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 32, n. 3, p. 190–196, 1 jul. 2015.
- GAVERIA-RIVERA, A. et al. Molecular identification of clinical isolates of fusarium in Colombia. **Revista de Salud Publica**, v. 20, n. 1, p. 94–102, 1 jan. 2018.
- GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 5–6, p. 473–479, jun. 2004.
- GHARIB, S. J.; ABDULLAH, S. K. Onychomycosis Due to Fusarium oxysporum in Sulumaniyah City, Iraq. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2020.
- GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**, v. 1, n. 3, 21 nov. 2013.
- GUARRO, J. **Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment** European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Springer Verlag, , 1 dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23934595/>>. Acesso em: 8 maio. 2021
- GUEVARA-SUAREZ, M. et al. Genotyping of Fusarium Isolates from Onychomycoses in Colombia: Detection of Two New Species Within the Fusarium solani Species Complex and In Vitro Antifungal Susceptibility Testing. **Mycopathologia**, v. 181, n. 3–4, p. 165–174, 1 abr. 2016.
- HERKERT, P. F. et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical fusarium species from Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, 2019.
- HIBBETT, D. et al. Sequence-based classification and identification of Fungi. **Mycologia**, v. 108, n. 6, p. 1049–1068, 1 nov. 2016.
- JANDER, G.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Positive correlation between virulence of Pseudomonas aeruginosa mutants in mice and insects. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3843–3845, jul. 2000.
- JORJ~ AO A, A. L. et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for Galleria mellonella rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, 2018.
- KAVANAGH, K.; SHEEHAN, G. **The use of galleria mellonella larvae to identify novel**

antimicrobial agents against fungal species of medical interest *Journal of Fungi* MDPI AG, , 1 set. 2018. Disponível em: <pmc/articles/PMC6162640/>. Acesso em: 9 maio. 2021

LAGUDAH, E. S.; KRATTINGER, S. G. A new player contributing to durable *Fusarium* resistance. *Nature Genetics*, v. 51, n. 7, p. 1070–1071, 1 jul. 2019.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. [s.l.] Blackwell Publishing, 2007.

LI, X. et al. Photodynamic inactivation of fibroblasts and inhibition of *Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation by toluidine blue O. *Molecular Medicine Reports*, v. 15, n. 4, p. 1816–1822, 1 abr. 2017.

LIRA, V. L. et al. Hyperparasitism of *Fusarium* spp. in *Austropuccinia psidii* in “Jambo-do-Pará”. *Summa Phytopathologica*, v. 45, n. 2, p. 204–206, 1 abr. 2019.

LIU, Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Clinical and Translational Research*, v. 1, n. 3, p. 140–167, 2015.

LÓPEZ-MAURY, L.; MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. **Tuning gene expression to changing environments: From rapid responses to evolutionary adaptation** *Nature Reviews Genetics* Nat Rev Genet, , ago. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18591982/>>. Acesso em: 9 maio. 2021

LÓPEZ-RIBOT, J. L. **Candida albicans biofilms: More than filamentation** *Current Biology* Curr Biol, , 21 jun. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15964263/>>. Acesso em: 9 maio. 2021

LÓPEZ HERNÁNDEZ, Y. et al. **Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 2015. Disponível em: <pmc/articles/PMC4316775/>. Acesso em: 9 maio. 2021

LORTHOLARY, O.; FERNÁNDEZ-RUIZ, M.; PERFECT, J. R. The current treatment landscape: Other fungal diseases (cryptococcosis, fusariosis and mucormycosis). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. suppl_2, p. ii31–ii36, 1 nov. 2016.

MAHMOUDI, S. et al. **Fungal keratitis: An overview of clinical and laboratory aspects** *Mycoses* Blackwell Publishing Ltd, , 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29992633/>>. Acesso em: 8 maio. 2021

MARINACH-PATRICE, C. et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, n. 7, p. 634–642, 2009.

MARUKUTIRA, T. et al. Clinical characteristics and outcomes in 303 HIV-infected patients with invasive fungal infections: Data from the prospective antifungal therapy alliance registry, a multicenter, observational study. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, v. 6, p. 39–47, 13 mar. 2014.

MCCARTHY, M. W. et al. Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. *Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. suppl_3, p. S474–S483, 15 jan. 2017.

MIKAMI, R.; STEMMERMANN, G. N. Keratomycosis caused by *Fusarium oxysporum*. *American journal of clinical pathology*, v. 29, n. 3, p. 257–262, 1 mar. 1958.

MIKULAK, E. et al. **Galleria mellonella L. as model organism used in biomedical and other studies** *Przegląd epidemiologiczny* NLM (Medline), , 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29667381/>>. Acesso em: 10 maio. 2021

MUHAMMED, M. et al. *Fusarium* infection: Report of 26 cases and review of 97 cases from the literature. *Medicine (United States)*, v. 92, n. 6, p. 305–316, nov. 2013.

- MUKHERJEE, P. K. et al. Characterization of *Fusarium* Keratitis Outbreak Isolates: Contribution of Biofilms to Antimicrobial Resistance and Pathogenesis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 53, n. 8, p. 4450–4457, jul. 2012.
- MYLONAKIS, E. *Galleria mellonella* and the Study of Fungal Pathogenesis: Making the Case for Another Genetically Tractable Model Host. [s.d.].
- MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842–3850, jul. 2005.
- NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAÏSSIE, E. J. **Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species** *Clinical Microbiology Reviews* American Society for Microbiology, , 1994. Disponível em: </pmc/articles/PMC358338/?report=abstract>. Acesso em: 9 maio. 2021
- NINET, B. et al. Molecular identification of *Fusarium* species in onychomycoses. **Dermatology**, v. 210, n. 1, p. 21–25, 2005.
- NIR-PAZ, R. et al. Clinical and epidemiological aspects of infections caused by *Fusarium* species: A collaborative study from Israel. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3456–3461, ago. 2004.
- NORMAND, A.-C. et al. Clinical Origin and Species Distribution of *Fusarium* spp. Isolates Identified by Molecular Sequencing and Mass Spectrometry: A European Multicenter Hospital Prospective Study. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 246, 25 mar. 2021.
- NOWIK, K. E. et al. A single-centre retrospective observational study of fungal keratitis in poland with a review of findings in europe. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 27, n. 3, p. 343–347, 11 set. 2020.
- O'DONNELL, K. et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2235–2248, jul. 2007.
- O'DONNELL, K. et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* Species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2477–2490, ago. 2008.
- O'DONNELL, K. et al. **DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions** *Phytoparasitica* Springer Netherlands, , 1 nov. 2015. Disponível em: <www.cbs.knaw.nl/fusarium/;>. Acesso em: 9 maio. 2021
- O'DONNELL, K. et al. Marasas et al. 1984 “Toxicogenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology” revisited. **Mycologia**, v. 110, n. 6, p. 1058–1080, 2 nov. 2018.
- PACKEU, A. et al. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. **Medical Mycology**, v. 51, n. 6, p. 580–585, 2013.
- PARK, B. et al. Cyber infrastructure for *Fusarium*: Three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 1, p. D640, jan. 2011.
- PAZIANI, M. H. et al. Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 197–203, 1 mar. 2019.
- PEIQIAN, L. et al. Biofilm formation by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and susceptibility to environmental stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 350, n. 2, p. 138–145, jan. 2014.

- PENG, Y. et al. MALDI-TOF MS for the rapid identification and drug susceptibility testing of filamentous fungi. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 18, n. 6, p. 4865, 22 out. 2019.
- PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. **The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management***The Lancet Infectious Diseases* Lancet Publishing Group, , 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28774698/>>. Acesso em: 9 maio. 2021
- PIERCE, C. G. et al. **The Candida albicans biofilm matrix: Composition, structure and function***Journal of Fungi* MDPI AG, , 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28516088/>>. Acesso em: 10 maio. 2021
- PIRACCINI, B. M. et al. **Ciclopirox Hydroxypropyl Chitosan (HPCH) Nail Lacquer: A Review of Its Use in Onychomycosis***Dermatology and Therapy* Adis, , 1 out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12555215>>. Acesso em: 9 maio. 2021
- RAGASA, L. R. P. et al. Transcriptome analysis reveals involvement of oxidative stress response in a copper-tolerant Fusarium oxysporum strain. **Fungal Biology**, 11 jan. 2021.
- RAMMLAIR, A.; MÜHLETHALER, K.; HANEKE, E. Fusarium onychomycoses in Switzerland—A mycological and histopathological study. **Mycoses**, v. 62, n. 10, p. 928–931, 1 out. 2019.
- RAVINDRA BABU, P. et al. Efficacy and safety of terbinafine 500 mg once daily in patients with dermatophytosis. **Indian Journal of Dermatology**, v. 62, n. 4, p. 395–399, 1 jul. 2017.
- REEVE, M. A.; STEWART, H.; RYAN, M. J. MALDI-TOF MS spectral variation is observed between fungal samples grown under identical conditions after long-term storage by cryopreservation, freeze-drying, and under oil. [s.d.].
- RIZZATO, C. et al. **Pushing the limits of MALDI-TOF mass spectrometry: Beyond fungal species identification***Journal of Fungi* MDPI AG, , 1 dez. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC5753130/>. Acesso em: 9 maio. 2021
- ROBERTS, D. T.; TAYLOR, W. D.; BOYLE, J. **Guidelines for treatment of onychomycosis***British Journal of Dermatology* Br J Dermatol, , 1 mar. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12653730/>>. Acesso em: 10 maio. 2021
- RODRIGUES, G. B. et al. Susceptibilities of the dermatophytes Trichophyton mentagrophytes and T. rubrum microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 116, p. 89–94, 5 nov. 2012.
- RODRIGUES, G. B. et al. In vitro photodynamic inactivation of Candida species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 2, p. 141–149, 1 maio 2013.
- RODRIGUEZ, R. et al. Polyphasic, including maldi-tof ms, evaluation of freeze-drying long-term preservation on aspergillus (Section nigri) strains. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, 1 set. 2019.
- RYCHERT, J. et al. Multicenter Evaluation of the Vitek MS v3.0 System for the Identification of Filamentous Fungi. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 2, 1 fev. 2018.
- SALEHI, Z.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Antifungal drug susceptibility profile of clinically important dermatophytes and determination of point mutations in terbinafine-resistant isolates. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 10, p. 1841–1846, 1 out. 2018.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B. **Susceptibility testing of fungi to antifungal drugs***Journal of Fungi* MDPI AG, , 1 set. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6162686/>. Acesso em: 10 maio. 2021

- SAV, H. et al. Biofilm formation and resistance to fungicides in clinically relevant members of the fungal genus *Fusarium*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 16, 1 mar. 2018.
- SCULLY, L. R.; BIDOCHKA, M. J. **Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens****FEMS Microbiology Letters**FEMS Microbiol Lett, , out. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16958844/>>. Acesso em: 9 maio. 2021
- SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 163–172, 19 set. 2018.
- SHORT, D. P. G.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Clonality, recombination, and hybridization in the plumbing-inhabiting human pathogen *Fusarium keratoplasticum* inferred from multilocus sequence typing. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 91, 26 abr. 2014.
- SLATER, J. L. et al. **Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice**. Medical Mycology. **Anais...**abr. 2011
- SUGAWARA, Y. et al. Clinical utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders. **European Journal of Haematology**, v. 90, n. 4, p. 331–339, abr. 2013.
- SUGIURA, K. et al. The low keratin affinity of efinaconazole contributes to its nail penetration and fungicidal activity in topical onychomycosis treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3837–3842, 2014.
- TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility of Clinical *Fusarium* Species From Brazil. 2019.
- TEIXEIRA, L. M.; COELHO, L.; TEBALDI, N. D. CHARACTERIZATION OF *Fusarium oxysporum* ISOLATES AND RESISTANCE OF PASSION FRUIT GENOTYPES TO FUSARIOSIS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 3, 17 ago. 2017.
- TONANI, L. et al. In vitro susceptibilities of *Neoscytalidium* spp. sequence types to antifungal agents and antimicrobial photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers. **Fungal Biology**, v. 122, n. 6, p. 436–448, 1 jun. 2018.
- TORTORANO, A. M. et al. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infections due to *Fusarium* species in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 9, p. 1623–1630, 2014.
- TREMBLAY, J. F. et al. Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: Cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 1, n. 11, p. 852–856, 1 nov. 2002.
- TROVATO, L. et al. Case Report: Molecular Diagnosis of Fungal Keratitis Associated With Contact Lenses Caused by *Fusarium solani*. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 24 mar. 2021.
- TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. ***Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing****Virulence**Taylor and Francis Inc., , 2 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26730990/>>. Acesso em: 9 maio. 2021
- TUPAKI-SREEPURNA, A. et al. Multidrug-resistant *Fusarium* in keratitis: a clinico-mycological study of keratitis infections in Chennai, India. **Mycoses**, v. 60, n. 4, p. 230–233, 1 abr. 2017.
- VAN DIEPENINGEN, A. D. et al. **Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory****Current Fungal Infection Reports**Current Medicine Group LLC 1, , 17 set. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26730990/>>. Acesso em: 9 maio. 2021
- VARON, A. G. et al. Superficial skin lesions positive for *Fusarium* are associated with

subsequent development of invasive fusariosis. **Journal of Infection**, v. 68, n. 1, p. 85–89, 1 jan. 2014.

WAINWRIGHT, M. et al. Phenothiazinium photoantimicrobials with basic side chains. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 150, p. 38–43, 1 set. 2015.

WAINWRIGHT, M. et al. **Photoantimicrobials—are we afraid of the light?** **The Lancet Infectious Diseases** Lancet Publishing Group, , 1 fev. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5280084/>. Acesso em: 9 maio. 2021

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. **Methylene Blue - A therapeutic dye for all seasons?** **Journal of Chemotherapy** E.S.I.F.T. srl, , 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12462423/>. Acesso em: 9 maio. 2021

WAINWRIGHT, M.; MEEGAN, K.; LOUGHRAN, C. Phenothiazinium photosensitisers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents. **Dyes and Pigments**, v. 91, n. 1, p. 1–5, out. 2011.

WALTHER, G. et al. Fusarium keratitis in Germany. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2983–2995, 1 out. 2017.

WANG, C. J. et al. Colonization of human opportunistic Fusarium oxysporum (HOFo) isolates in tomato and cucumber tissues assessed by a specific molecular marker. **PLoS ONE**, v. 15, n. 6, p. e0234517, 1 jun. 2020.

WANG, Y. et al. Utility of insects for studying human pathogens and evaluating new antimicrobial agents. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 135, p. 1–25, 2013.

WICKES, B. L.; WIEDERHOLD, N. P. **Molecular diagnostics in medical mycology** **Nature Communications** Nature Publishing Group, , 1 dez. 2018. Disponível em: <www.nature.com/naturecommunications>. Acesso em: 9 maio. 2021

WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 249–259, 29 ago. 2017.

WU, G.; XU, L.; YI, Y. Galleria mellonella larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionate cellular and humoral immune responses. **Immunology Letters**, v. 174, p. 45–52, 1 jun. 2016.

ZHOU, S. et al. In vitro photodynamic inactivation effects of benzylidene cyclopentanone photosensitizers on clinical fluconazole-resistant Candida albicans. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 22, p. 178–186, 1 jun. 2018.

ANEXO I - Resultados gerais dos 108 isolados clínicos do gênero *Fusarium*. ID, identificação; CE, Complexo de Espécies; DP, desvio padrão; AMB, anfotericina B; TER, terbinafina; CPX, ciclopirox olamina; VOR, voriconazol; ITR, itraconazol; NI, não identificado; FSSC, complexo de espécies *F. solani*; FOSC, complexo de espécies *F. oxysporum*; FFSC, complexo de espécies *F. fujikuroi*; FDSC, complexo de espécies *F. dimerum*; *, CIM maior que o valor de corte epidemiológico (*epidemiological cutoff value* – ECV) Espinel-Ingroff et al., 2016); -, não realizado; **, isolados clínicos avaliados na terapia fotodinâmica antimicrobiana; ***, isolados clínicos avaliados na virulência em *G. mellonella*.

Isolado Clínico LMC	Material Biológico	ID molecular		ID MALDI-TOF MS	Antifúngicos (µg ml ⁻¹)					Biomassa (570 nm)	Biofilme		
		CE	Espécies		AMB	TER	CPX	ITR	VOR		DP	Matriz (492 nm)	DP
7101.01	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	>128	16	32*	16*	0,480	0,025	0,632	0,076
7104.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	>128	16	>32*	>16*	0,201	0,017	0,091	0,005
7106.02	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	>128	16	>32*	4	0,511	0,089	0,027	0,009
7108.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	64	1	>32*	1	0,442	0,012	0,163	0,104
7110.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	>128	16	>32*	16*	0,744	0,072	0,066	0,030
7110.02	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	128	8	>32*	8	0,247	0,012	0,655	0,004
7114.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	>128	16	32*	16*	0,764	0,043	0,523	0,112
7115.02	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	>128	32	32*	16*	2,544	0,158	1,310	0,060
7118.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	8	16	4	0,642	0,131	0,770	0,008
7119.01***	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	128	16	16	16*	0,153	0,015	0,070	0,161
7120.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	16	16	16*	0,877	0,012	0,075	0,065
7122.02	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	2	8	>32*	2	0,997	0,086	0,530	0,011
7123.01	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	32	16	32	1	0,995	0,039	0,580	0,090
7125.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	>128	1	16	8	0,020	0,019	0,066	0,125
7125.02	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	2	16	>32*	1	0,103	0,062	0,367	0,032
7127.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	128	16	>32*	16*	0,335	0,142	0,270	0,002
7129.01***	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	8	>32*	8	0,985	0,077	0,508	0,008
7129.02	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	16	>32*	16*	0,071	0,057	0,069	0,067

7132.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	8	>32*	16*	0,785	0,041	0,895	0,065
7133.01***	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	N/I	2	1	8	>32*	16*	0,048	0,038	0,020	0,015
7134.01***	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	4	1	1	>32*	8	0,263	0,093	0,325	0,022
7135.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	1	2	>32*	16*	0,166	0,007	0,223	0,006
7136.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	8	16	>32*	2	0,138	0,002	0,428	0,149
7140.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	16	>32*	16*	0,049	0,002	0,056	0,200
7141.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	16	>32*	4	0,703	0,049	0,707	0,009
7145.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	32	>32*	8	0,672	0,087	0,535	0,006
7146.01***	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	16	>32*	8	0,168	0,017	0,148	0,104
7147.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	16	>32*	8	0,153	0,040	0,262	0,060
7149.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	32	>32*	16*	3,230	0,082	1,210	0,030
7150.01**	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	128	32	>32*	16*	3,544	0,079	1,310	0,018
7151.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	128	32	>32*	16*	0,508	0,026	0,520	0,075
7152.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	2	16	32*	16*	0,926	0,056	0,308	0,050
7153.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	>128	16	>32*	8	0,370	0,004	0,425	0,021
7158.01***	sangue	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	128	4	>32*	2	0,879	0,057	0,675	0,012
7159.01	sangue	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	128	32	>32*	16*	0,908	0,017	0,144	0,104
7165.01	sangue	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	64	8	>32*	8	0,088	0,034	0,134	0,111
7167.01	sangue	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	4	8	>32*	8	0,279	0,010	0,652	0,127
7173.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	16	4	>32*	2	0,838	0,006	0,498	0,123
7174.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	16	16	16	4	2,838	0,140	1,498	0,037
7175.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	32	8	16	4	0,219	0,188	0,039	0,065
7178.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	8	8	8	4	0,166	0,031	0,101	0,109
7179.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	8	8	16	2	0,065	0,081	0,328	0,012
7180.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	2	1	>32*	1	0,100	0,111	0,193	0,033
7184.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	4	2	>32*	8	0,385	0,037	0,518	0,034
7186.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	16	8	16	2	0,444	0,006	0,448	0,031
7188.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	16	8	8	2	0,983	0,035	0,443	0,009
7190.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	>128	8	32*	16	1,968	0,146	1,978	0,055

7191.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	>128	16	32*	16*	2,651	0,003	1,267	0,038
7194.01	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	4	4	32*	16*	2,198	0,055	1,076	0,185
7195.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	8	8	0,25	2	2,189	0,018	1,077	0,020
7196.01	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	8	8	0,25	2	3,268	0,015	1,444	0,480
7200.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	16	1	1	1	0,506	0,036	0,356	0,003
7203.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	4	2	0,25	1	2,651	0,005	1,545	0,020
7204.01***	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	0,5	2	>32*	8	3,443	0,002	1,448	0,020
7205.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	2	2	1	32*	0,596	0,007	0,678	0,022
7206.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	1	1	16	2	0,333	0,096	0,471	0,046
7207.01	pele	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	N/I	2	32	2	>32*	1	0,526	0,050	0,658	0,051
7208.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	2	1	1	>32*	1	0,659	0,011	0,318	0,025
7209.01	unha	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC	1	2	1	>32*	16*	0,033	0,009	0,490	0,023
7124.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	4	1	16	8	0,740	0,018	0,597	0,036
7113.02	pele	FSSC	<i>F. solani</i>	FOSC	2	16	8	16	16*	2,317	0,059	1,558	0,178
7115.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	>128	32	32*	16*	1,303	0,035	1,251	0,114
7128.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	128	4	>32*	4	2,513	0,041	1,457	0,036
7131.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	8	8	>32*	4	0,016	0,010	0,085	0,220
7139.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FOSC	2	64	8	>32*	4	0,317	0,123	0,558	0,033
7142.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	2	4	1	8	0,063	0,053	0,170	0,022
7143.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	128	32	>128*	8	0,528	0,036	0,599	0,045
7144.01***	peritônio	FSSC	<i>F. solani</i>	N/I	2	128	32	>32*	2	0,306	0,118	0,253	0,142
7148.01	pele	FSSC	<i>F. solani</i>	FOSC	2	128	16	>32*	4	0,386	0,086	0,271	0,072
7157.01***	sangue	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	128	2	>32*	2	0,265	0,056	0,226	0,069
7160.02	sangue	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	2	2	>32*	4	3,465	0,056	2,270	0,072
7161.01	sangue	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	4	4	>32*	2	0,387	0,084	0,275	0,012
7163.01	sangue	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	4	2	>32*	4	0,118	0,054	0,310	0,062
7164.01	sangue	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	>128	2	>32*	8	0,088	0,015	0,118	0,013
7166.01	sangue	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	8	16	>32*	8	1,953	0,022	0,588	0,036
7169.01	sangue	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	8	4	16	1	1,341	0,011	0,529	0,135

7176.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	16	8	16	4	0,256	0,020	0,542	0,075
7181.01***	pele	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	8	8	>32*	2	1,279	0,100	0,532	0,011
7182.01***	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	8	8	>32*	4	2,184	0,027	1,189	0,322
7183.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	8	8	>32*	4	0,311	0,060	0,189	0,365
7185.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	16	8	16	2	2,050	0,040	0,369	0,611
7189.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	8	8	16	2	1,623	0,011	0,654	0,074
7192.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	>128	32	32	8	2,855	0,052	1,189	0,057
7197.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	8	8	0,5	2	1,389	0,015	0,851	0,034
7201.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	64	2	1	8	3,465	0,051	1,970	0,112
7211.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	2	2	1	>32*	8	1,524	0,127	0,767	0,066
7214.01	unha	FSSC	<i>F. solani</i>	FSSC	1	4	1	>32*	0,5	1,201	0,082	1,074	0,040
7102.01***	unha	FSSC	<i>F. falciforme</i>	FSSC	2	>128	16	32*	16*	0,854	0,031	0,357	0,037
7112.01***	unha	FSSC	<i>F. falciforme</i>	FSSC	2	64	16	>32*	16*	0,316	0,017	0,288	0,065
7177.01***	unha	FSSC	<i>F. falciforme</i>	FSSC	0,25	8	8	16	2	0,182	0,060	0,728	0,093
7187.01	unha	FSSC	<i>F. falciforme</i>	FSSC	0,25	8	4	16	2	0,567	0,082	0,864	0,055
7193.01	unha	FSSC	<i>F. falciforme</i>	FSSC	2	>128	16	32	16	1,425	0,032	1,605	0,128
7198.01	unha	FSSC	<i>F. falciforme</i>	FSSC	1	2	2	1	8	0,531	0,107	0,556	0,023
7199.01	unha	FSSC	<i>F. falciforme</i>	FSSC	1	>128	1	>32*	8	1,913	0,016	1,853	0,281
7202.01	unha	FSSC	<i>F. falciforme</i>	FSSC	1	4	4	4	1	0,227	0,782	0,672	0,079
7210.01***	pele	FSSC	<i>F. falciforme</i>	N/I	1	1	2	>32*	0,25	1,923	0,093	1,456	0,036
7162.02***	sangue	FSSC	<i>F. petroliphilum</i>	FSSC	2	4	2	>32*	2	0,349	0,055	0,248	0,030
7168.01***	sangue	FSSC	<i>F. petroliphilum</i>	FSSC	2	4	1	>128*	16	0,532	0,106	0,157	0,017
7138.01**/**	unha	FFSC	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. proliferatum</i>	2	>128	16	8	2	0,122	0,172	1,214	0,097
7215.01***	pele	FDSC	<i>F. delphinoides</i>	<i>F. dimerum</i>	1	2	1	16	2	0,328	0,068	0,222	0,007
7117.01	pele	FOSC	<i>F. oxysporum</i>	FSSC	2	0,5	8	8	16*	0,066	0,024	0,031	0,045
7124.01	unha	FOSC	<i>F. oxysporum</i>	FOSC	1	4	1	16	8	0,013	0,113	0,020	0,102
7111.01	unha	FOSC	<i>F. oxysporum</i>	N/I	2	1	16	16	8	0,123	0,067	0,012	0,015
7130.01	unha	FOSC	<i>F. oxysporum</i>	FOSC	2	1	4	>32*	8	0,021	0,092	0,541	0,018
7137.01	unha	FOSC	<i>F. oxysporum</i>	FOSC	2	4	1	16	2	0,111	0,018	0,124	0,032

7145.02**	pele	FOSC	<i>F. oxysporum</i>	FSSC	1	128	1	>32*	16*	0,151	0,016	0,307	0,177
7170.01	sangue	FOSC	<i>F. oxysporum</i>	FOSC	1	8	4	16	1	0,729	0,022	0,998	0,007
7172.01	unha	FOSC	<i>F. oxysporum</i>	N/I	1	16	4	16	1	0,223	0,052	0,144	0,021
ATCC36031	-	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	-	2	128	16	16	16*	-	-	-	-
ATCC48112	-	FOSC	<i>F. oxysporum</i>	-	2	1	8	16	8	-	-	-	-

ANEXO II – Resultados gerais de identificação de 108 isolados clínicos do gênero *Fusarium* por sequenciamento. ITS (*internal transcribed spacer*); EF1 α (*elongation factor 1-alpha*); MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*). %ID (porcentagem de identificação), N / I, não identificação significativa.

Strain codes	ITS	%ID	<i>e</i> -value	Genebank reference	<i>EF1α</i>	%ID	<i>e</i> -value	Genebank reference	MALDI-TOF MS	Score	NCBI ITS	NCBI EF1 α
7101.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.410	MN729363	MN854098
7102.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. falciforme</i>	99	0	AB817182.1	FSSC	1.530	MN729364	MN854099
7104.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.930	MN729365	MN854100
7106.02	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.450	MN729366	MN854101
7108.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	2.040	MN729367	MN854102
7110.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.550	MN729368	MN854103
7110.02	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.780	MN729369	MN854104
7112.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. falciforme</i>	99	0	AB817182.1	FSSC	1.610	MN729370	MN854105
7113.02	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FOSC	1.480	MN729371	MN854106
7114.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.580	MN729372	MN854107
7115.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.970	MN729373	MN854108
7115.02	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.580	MN729374	MN854109
7118.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.560	MN729375	MN854110
7119.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.320	MN729376	MN854111
7120.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.430	MN729377	MN854112
7122.03	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.680	MN729378	MN854113
7123.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.850	MN729379	MN854114
7125.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.660	MN729380	MN854115
7125.02	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.610	MN729381	MN854116
7127.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.570	MN729382	MN854117
7128.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.750	MN729383	MN854118

7129.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.430	MN729384	MN854119
7129.02	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.850	MN729385	MN854120
7131.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FSSC	1.800	MN729386	MN854121
7132.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.210	MN729387	MN854122
7133.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	N/I	-	MN729388	MN854123
7134.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.440	MN729389	MN854124
7135.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.460	MN729390	MN854125
7136.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.850	MN729391	MN854126
7139.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FOSC	1.460	MN729392	MN854127
7140.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.510	MN729393	MN854128
7141.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	2.080	MN729394	MN854129
7142.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FSSC	1.430	MN729395	MN854130
7143.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FSSC	1.560	MN729396	MN854131
7144.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	N/I	-	MN729397	MN854132
7145.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	2.070	MN729398	MN854133
7146.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.940	MN729399	MN854134
7147.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.730	MN729400	MN854135
7148.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FOSC	1.220	MN729401	MN854136
7149.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.540	MN729402	MN854137
7150.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.660	MN729403	MN854138
7151.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.650	MN729404	MN854139
7152.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.860	MN729405	MN854140
7153.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.460	MN729406	MN854141
7157.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FSSC	1.860	MN729407	MN854142
7158.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.970	MN729408	MN854143
7159.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	2.150	MN729409	MN854144
7160.02	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.770	MN729410	MN854145
7161.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FSSC	1.680	MN729411	MN854146
7162.02	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. petroliphilum</i>	100	0	MF467468.1	FSSC	1.870	MN729412	MN854147
7163.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.910	MN729413	MN854148
7164.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.980	MN729414	MN854149
7165.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.660	MN729415	MN854150
7166.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.320	MN729416	MN854151

7167.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	2.010	MN729417	MN854152
7168.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. petroliphilum</i>	100	0	MF467468.1	FSSC	1.950	MN729418	MN854153
7169.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	2.230	MN729419	MN854154
7173.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.640	MN729420	MN854155
7174.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.980	MN729421	MN854156
7175.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.600	MN729422	MN854157
7176.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.620	MN729423	MN854158
7177.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. falciforme</i>	100	0	AB817182.1	FSSC	1.620	MN729424	MN854159
7178.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.570	MN729425	MN854160
7179.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	99	0	KU933434.1	FSSC	1.640	MN729426	MN854161
7180.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	2.060	MN729427	MN854162
7181.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.550	MN729428	MN854163
7182.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.540	MN729429	MN854164
7183.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.710	MN729430	MN854165
7184.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.750	MN729431	MN854166
7185.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.570	MN729432	MN854167
7186.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.500	MN729433	MN854168
7187.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. falciforme</i>	100	0	AB817182.1	FSSC	1.990	MN729434	MN854169
7188.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.550	MN729435	MN854170
7189.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	2.130	MN729436	MN854171
7190.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.770	MN729437	MN854172
7191.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.650	MN729438	MN854173
7192.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	2.000	MN729439	MN854174
7193.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. falciforme</i>	100	0	AB817182.1	FSSC	1.730	MN729440	MN854175
7194.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.700	MN729441	MN854176
7195.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.470	MN729442	MN854177
7196.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.520	MN729443	MN854178
7197.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FSSC	1.410	MN729444	MN854179
7198.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. falciforme</i>	100	0	AB817182.1	FSSC	1.450	MN729445	MN854180
7199.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. falciforme</i>	99	0	AB817182.1	FSSC	1.400	MN729446	MN854181
7200.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	0.990	MN729447	MN854182
7201.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	100	0	DQ247559.1	FSSC	1.880	MN729448	MN854183
7202.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. falciforme</i>	100	0	AB817182.1	FSSC	1.760	MN729449	MN854184

7203.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.550	MN729450	MN854185
7204.01	FSSC	100	0	KR527137.2	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.270	MN729451	MN854186
7205.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.700	MN729452	MN854187
7206.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	2.100	MN729453	MN854188
7207.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	N/I	-	MN729454	MN854189
7208.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.600	MN729455	MN854190
7209.01	FSSC	99	0	KR527137.1	<i>F. keratoplasticum</i>	100	0	KU933434.1	FSSC	1.960	MN729456	MN854191
7210.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. falciforme</i>	99	0	AB817182.1	N/I	-	MN729457	MN854192
7211.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FSSC	1.530	MN729458	MN854193
7214.01	FSSC	100	0	KR527137.1	<i>F. solani</i>	99	0	DQ247559.1	FSSC	1.680	MN729459	MN854194
7111.02	FOSC	100	0	JN624906.3	<i>F. oxysporum</i>	100	0	KM065857.1	FSSC	1.660	MN7146.24	MN854195
7117.01	FOSC	100	0	JN624906.3	<i>F. oxysporum</i>	100	0	KM065857.1	FSSC	1.660	MN7146.24	MN854196
7122.02	FOSC	100	0	JN624906.3	<i>F. oxysporum</i>	100	0	KM065857.1	FOSC	1.190	MN7146.25	MN854197
7124.01	FOSC	100	0	JN624906.3	<i>F. oxysporum</i>	99	0	KM065857.1	N/I	-	MN7146.26	MN854198
7130.01	FOSC	99	0	JN624906.3	<i>F. oxysporum</i>	100	0	KM065857.1	FOSC	1.820	MN7146.27	MN854199
7137.01	FOSC	99	0	JN624906.3	<i>F. oxysporum</i>	100	0	KM065857.1	FOSC	1.670	MN7146.28	MN854200
7145.02	FOSC	100	0	JN624906.3	<i>F. oxysporum</i>	100	0	KM065857.1	FSSC	1.170	MN7146.29	MN854201
7170.01	FOSC	100	0	JN624906.3	<i>F. oxysporum</i>	100	0	KM065857.1	FOSC	2.000	MN7146.30	MN854202
7172.01	FOSC	100	0	JN624906.3	<i>F. oxysporum</i>	100	0	KM065857.1	N/I	-	MN7146.31	MN854203
7138.01	FFSC	99	0	MG543780	<i>F. proliferatum</i>	100	0	KT239489.1	FFSC	1.960	MN729462	MN854204
7215.01	FDSC	100	0	NR130680.1	<i>F. delphinoides</i>	100	0	KX377697.1	FDSC	1.460	MN708342	MN854205

ANEXO III – Publicações Científicas