

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Rafael Sanchez Luperini

Análise fenotípica comparativa de espécies não-patogênicas *Aspergillus fischeri* e *A. oerlinghausenensis* filogeneticamente próximas à espécie virulenta *A. fumigatus*

Ribeirão Preto
2023

Rafael Sanchez Luperini

Análise fenotípica comparativa de espécies não-patogênicas *Aspergillus fischeri* e *A. oerlinghausenensis* filogeneticamente próximas à espécie virulenta *A. fumigatus*

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Co-Orientador: Thaila Fernanda dos Reis

Ribeirão Preto

2023

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.

Luperini, Rafael Sanchez

Análise fenotípica comparativa de espécies não-patogênicas *Aspergillus fischeri* e *A. oerlinghausenensis* filogeneticamente próximas à espécie virulenta *A. fumigatus*. Ribeirão Preto, 2023.

137 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Goldman, Gustavo Henrique.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. *Aspergillus oerlinghausenensis*. 3. *Aspergillus fischeri*. 4. RNAseq. 5. Virulência.

Rafael Sanchez Luperini

Análise fenotípica comparativa de espécies não-patogênicas *Aspergillus fischeri* e *A. oerlinghausenensis* filogeneticamente próximas à espécie virulenta *A. fumigatus*.

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Co-Orientador: Thaila Fernanda dos Reis

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos aqueles que contribuíram para minha formação,
não somente como profissional, mas como pessoa.
Também dedico esse trabalho a todos que contribuíram profissionalmente e
intelectualmente, tanto com a idealização desse projeto, como com a
realização da parte prática e escrita.

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço ao professor Gustavo Henrique Goldman por aceitar ser meu orientador durante os dois anos do mestrado, fornecendo toda a estrutura disponível em seu laboratório, bem como seus valiosos ensinamentos.

À Thaila Fernanda dos Reis por ter me convidado para integrar o time do laboratório do prof. Goldman e por ser minha co-orientadora durante todo o decorrer do projeto.

Aos técnicos do laboratório, Marcela Savoldi, Lívia Marangoni Alfaya e Paulo Sérgio de Carvalho, sempre muito atenciosos, pacientes e prestativos. Serei eternamente grato por toda a ajuda prestada, bem como pelos conhecimentos e conversas compartilhadas.

Aos meus colegas de laboratório, Patrícia A. de Castro, Ana Cristina Colabardini, Rafael W. Bastos, Clara Valero Fernández, Camila F. Pinzan, Maria Augusta C. Horta, Fábio Siena, Lilian P. Silva, Maísa M. Moraes e Ailton Pereira, por toda a ajuda com conhecimentos teóricos, práticos, aquela mãozinha amiga com os experimentos de sempre, e toda a parceria durante o cotidiano no laboratório.

À FFCLRP e ao Departamento de Biologia por ter me proporcionado os melhores anos da minha vida durante o meu curso de graduação, além de todos os ensinamentos sem precedentes e indispensáveis.

À FMRP e ao Programa de pós-graduação em Bioquímica por ter me aprovado como aluno, me concedido uma bolsa CAPES disponível para o programa, o que permitiu que esse projeto fosse possível.

E por último, mas não menos importante, aos meus amigos e à toda a minha família, em especial aos meus avós, pais, meu irmão, tios e primos. Vocês sempre foram fundamentais por toda a minha vida, e eu amo muito a todos, especialmente por sempre acreditarem em mim, em meu potencial, além de me ajudarem em momentos difíceis e me proporcionarem os melhores momentos de minha vida.

RESUMO

LUPERINI, R. S. **Análise fenotípica comparativa de espécies não-patogênicas *Aspergillus fischeri* e *A. oerlinghausenensis* filogeneticamente próximas à espécie virulenta *A. fumigatus*.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023).

A seção *Fumigati* é composta por cepas fúngicas do gênero *Aspergillus* com patogenicidade variável. Dentro dessa seção, *Aspergillus fumigatus*, um patógeno oportunista, é a principal espécie responsável pelo quadro de aspergilose pulmonar invasiva (API), respondendo por cerca de 90% dos casos de API no mundo. Alguns estudos indicam que a maior virulência da espécie *A. fumigatus* em relação a outras espécies filogeneticamente próximas, pode estar relacionada à capacidade dessa espécie de crescer em altas temperaturas e em condições limitantes de nutrientes, além da habilidade de produzir metabólitos secundários (MSs) específicos que, em conjunto, favorecem a patogenicidade e auxiliam a sobrevivência do patógeno no ambiente encontrado dentro do pulmão dos hospedeiros humanos. API é estabelecida após a inalação de conídios onipresentes, suspensos no ar ambiente, pelo hospedeiro humano. Em indivíduos saudáveis, após a inalação dos conídios, estes são prontamente eliminados por células do sistema imune inato, como macrófagos e neutrófilos. Entretanto, em pacientes com disfunções imunes ou condições pulmonares preexistentes, a eliminação do conídio pode falhar, permitindo a germinação dos esporos, o crescimento fúngico no epitélio pulmonar e, conseqüentemente, o desenvolvimento da API.

Devido a temperatura intracorpórea do hospedeiro humano, a termotolerância é uma característica fundamental para o estabelecimento da API. No entanto, pouco se conhece acerca de genes de *A. fumigatus* expressos exclusivamente em situação de adaptação a temperaturas elevadas. O objetivo dessa dissertação foi analisar, de forma comparativa, as características fenotípicas que diferem *A. fumigatus* de outras 3 espécies da sessão *Fumigati*, não frequentemente relacionadas a API, porém filogeneticamente próximas: *A. oerlinghausenensis*, *A. fischeri* e *A. lentulus*. As quatro espécies passaram por uma série de análises, sendo as espécies *A. fumigatus*, *A. fischeri* e *A. oerlinghausenensis* selecionadas para uma análise de sequenciamento de RNA (RNAseq) cujo principal objetivo foi a identificação de genes diferencialmente expressos em *A. fumigatus* após a transição de 30°C para 37°C. Genes com maior taxa de transcrição em *A. fumigatus* e pouco expressos nas demais espécies (e vice-versa) podem fornecer boas pistas a respeito das vias metabólicas responsáveis pela maior virulência observada em *A. fumigatus*.

Em resumo, este estudo promove ferramentas para futuras discussões em busca de um maior entendimento dos mecanismos e fundamentos moleculares que conferem um maior índice de patogenicidade à *A. fumigatus*, uma das principais espécies de patógenos fúngicos humanos.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oerlinghausenensis*, *Aspergillus fischeri*, RNAseq, virulência.

ABSTRACT

LUPERINI, R. S. **Comparative phenotypic analysis of non-pathogenic species *Aspergillus fischeri* and *A. oerlinghausenensis* phylogenetically close to the virulent species *A. fumigatus*.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023).

The Fumigati section is composed of fungal strains of the *Aspergillus* genus with variable pathogenicity. Within this section, *Aspergillus fumigatus*, an opportunistic pathogen, is the main species responsible for invasive pulmonary aspergillosis (IPA), accounting for about 90% of cases of IPA in the world. Some studies indicate that the greater virulence of the species *A. fumigatus* in relation to other species phylogenetically close, may be related to the ability of this species to grow at high temperatures and in limiting conditions of nutrients, in addition to the ability to produce specific secondary metabolites (SMs) that, all together, favor pathogenicity and aid the survival of the pathogen in the environment found within the lung of human hosts. IPA is established after inhalation of ubiquitous conidia, suspended in ambient air, by the human host. In healthy individuals, after inhalation, conidia are promptly eliminated by cells of the innate immune system, such as macrophages and neutrophils. However, in patients with immune dysfunctions or pre-existing lung conditions, conidial clearance may fail, allowing spore germination, fungal growth in the lung epithelium and, consequently, the development of IPA.

Due to the intracorporeal temperature of the human host, thermotolerance is a fundamental characteristic for the establishment of IPA. However, little is known about *A. fumigatus* genes expressed exclusively in a situation of adaptation to high temperatures. The objective of this dissertation was to analyze, in a comparative way, the phenotypic characteristics that differ *A. fumigatus* from other 3 species from the *Fumigati* session, not frequently related to IPA, but phylogenetically close: *A. oerlinghausenensis*, *A. fischeri* and *A. lentulus*. The four species underwent a series of analyses, with the species *A. fumigatus*, *A. fischeri* and *A. oerlinghausenensis* selected for an RNA sequencing analysis (RNAseq) whose main objective was to identify genes differentially expressed in *A. fumigatus* after the transition from 30°C to 37°C. Genes with a higher transcription rate in *A. fumigatus* and little expression in other species (and vice versa) may provide good clues regarding the metabolic pathways responsible for the greater virulence observed in *A. fumigatus*.

In summary, this study provides tools for future discussions in search of a greater understanding of the mechanisms and molecular foundations that confer a higher pathogenicity index to *A. fumigatus*, one of the main species of human fungal pathogens.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oerlinghausenensis*, *Aspergillus fischeri*, RNAseq, virulence

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. O gênero <i>Aspergillus</i>	13
1.2. Casos clínicos relacionados ao gênero <i>Aspergillus</i>	14
1.3. A seção <i>Fumigati</i> e a evolução da virulência	17
1.4. Principais mecanismos envolvidos na progressão da API	20
1.4.1. Matriz extracelular, biofilme, proteínas estruturais e MSs	22
1.4.2. Metabolismo dos macronutrientes, carbono e nitrogênio	25
1.4.3. Metabolismo dos micronutrientes, ferro, cálcio e zinco	26
1.4.4. Adaptações à falta de oxigênio	30
1.4.5. Termotolerância	31
1.5. A importância da termotolerância para a virulência.....	33
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS GERAIS	38
2.1. Objetivos específicos.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Linhagens utilizadas neste trabalho	39
3.2. Meios de Cultura	39
3.2.1. Meio mínimo (MM, MM+UU)	39
3.2.2. Meio mínimo adaptado (MMA)	39
3.2.2.1. Meio de cultura para ensaios de escassez de ferro	39
3.2.2.2. Meio de cultura para ensaios de escassez de glicose.....	40
3.2.3. Potato Dextrose Ágar modificado (PDA)	40
3.2.4. Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU)	40
3.2.5. Meio YPD	41
3.2.6. Meio Luria Bertani (LB).....	41
3.2.7. Meio Beef extract.....	41
3.2.8. Meio Ágar + Soro Fetal Bovino.....	41

3.2.9. Meio RPMI-1640.....	41
3.3. Soluções e Tampões.....	42
3.3.1. Solução de elementos traços.....	42
3.3.2. Solução de sais 20X concentrada para MM.....	42
3.3.3. Soluções de protoplastização para transformação em <i>Aspergillus</i>	43
3.3.3.1. Solução 1 de protoplastização.....	43
3.3.3.2. Solução 2 de protoplastização.....	43
3.3.3.3. Solução 3 de protoplastização.....	43
3.3.3.4. Solução 4 de protoplastização.....	43
3.3.3.5. Solução 5 de protoplastização.....	44
3.3.4. Solução depurinizante.....	44
3.3.5. Solução salina citrato (SSC) 20X concentrada.....	44
3.3.6. Solução SDS 10%.....	44
3.3.7. Soluções estoque de drogas utilizadas.....	44
3.3.8. Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10X concentrado.....	45
3.3.9. Tampão de amostra para eletroforese de DNA.....	45
3.3.10. Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50X concentrado.....	45
3.3.11. Tampão de extração de DNA.....	45
3.3.12. Tampões para hibridização de sondas de Southern Blotting.....	45
3.3.12.1. Tampão de Hibridização.....	45
3.3.12.2. Tampão de Lavagem 1.....	46
3.3.12.3. Tampão de Lavagem 2.....	46
3.4. Protocolos adotados.....	46
3.4.1. Métodos de coleta de esporos e cultivo.....	46
3.4.1.1. Suspensão, contagem e diluição de esporos.....	46
3.4.2. Ensaio de fenotipagem.....	47
3.4.2.1. Crescimento radial em meio sólido.....	47

3.4.2.2. Crescimento em meio líquido e análises de peso seco	48
3.4.3. Quantificação da média esporos produzidos por cada espécie	48
3.4.4. Incubação de esporos, extração de RNA.....	48
3.4.5. Sequenciamento de RNA.....	50
3.4.6. Extração de DNA genômico	50
3.4.7. Produção de cDNA a partir das amostras utilizadas para o RNAseq..	51
3.4.8. Análises via qPCR.....	51
3.4.9. Ensaios <i>in vivo</i>	52
3.4.9.1. Declaração de ética	52
3.4.9.2. Modelo de <i>Galleria mellonella</i>	52
3.4.9.3. Modelo quimioterápico de infecção em camundongos	53
3.4.10. Análises da aderência de biofilme com Cristal Violeta.....	54
3.4.11. Análises via imagens geradas em microscópio	54
3.4.11.1. Medição de diâmetro de esporos.....	54
3.4.11.2. Análises de biofilme das espécies de <i>Aspergillus</i>	54
3.4.12. Análise estatística	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Caracterização fenotípica das cepas.....	55
4.1.1. <i>A. fumigatus</i> apresenta maior crescimento radial que outras espécies em temperaturas elevadas em diversos meios de cultura	55
4.1.2. Em meio líquido, <i>Aspergillus spp.</i> apresentam padrões de crescimento variados em diferentes meios de cultura.....	64
4.1.3. Diferenças entre tamanho de esporos não aparentam importância quanto ao fator virulência	67
4.1.4. <i>A. fumigatus</i> apresenta melhor desempenho ao se adaptar a danos na parede celular.....	68
4.1.5. <i>A. fumigatus</i> apresenta melhor desempenho ao se adaptar a condições de hipóxia e escassez de ferro.....	73

4.1.6. <i>A. fumigatus</i> apresenta maior aderência de biofilme em condições de hipóxia e normóxia	76
4.2. Caracterização de virulência das cepas em modelos <i>in vivo</i>	80
4.3. Análise transcriptômica para identificação de genes relacionados à termotolerância em <i>A. fumigatus</i>	83
4.4. Validação dos resultados do RNAseq	103
5. CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Aspergillus*

O gênero fúngico *Aspergillus* compreende mais de 340 espécies de fungos filamentosos, saprofíticos, comumente encontrados no ar, solo e em materiais em decomposição, sendo um gênero presente nos mais diversos ambientes do mundo (DAGENAIS; KELLER, 2009). Esse gênero de fungos também exerce um papel importante nos ciclos de carbono e nitrogênio, e podem ter relações benéficas ou maléficas com a humanidade e o meio ambiente (PARK et al., 2017; VAN DE VEERDONK et al., 2017).

Espécies do gênero *Aspergillus* são utilizadas em larga escala e nas mais variadas áreas. Neste sentido, *A. oryzae* é uma espécie utilizada há séculos na Ásia em processos tradicionais de fermentação de alimentos e bebidas, como saquê, molho de soja (shoyu), vinagres, entre outros (ICHISHIMA, 2016). *A. niger* é um fungo amplamente utilizado na indústria para produção de enzimas (amilases, pectinases, fitases e proteases), e ácidos orgânicos (ácido cítrico e glucônico) (SCHUSTER et al., 2002). Pode-se destacar também a espécie *A. terreus*, utilizada para produção de lovastatina, uma droga utilizada como tratamento em quadros de colesterol alto (HENDRICKSON et al., 1999).

O gênero *Aspergillus* também engloba espécies que afetam de forma negativa os seres humanos, visto que muitas estão envolvidas em processos de deterioração de alimentos, sendo que algumas delas também são responsáveis pela produção de micotoxinas, gerando grandes prejuízos econômicos em produções agrícolas, entre outros severos problemas para a saúde (HOUBRAKEN; DE VRIES; SAMSON, 2014). *A. niger* também é conhecido por causar doenças em plantas, como cebola, alho, amendoim e uvas, podendo causar problemas também após a colheita, gerando perda de qualidade e desvalorização dos produtos (SHARMA; BANERJEE; CHOUDHURY, 2012). *A. flavus* e *A. parasiticus* são espécies que crescem em milho, amendoim e soja, tanto no campo como durante o seu armazenamento, onde são secretadas aflatoxinas, uma das mais potentes substâncias carcinogênicas conhecidas na natureza. Exposição de animais e seres humanos à aflatoxina resulta em aflatoxicose, necrose hepática, seguida de

cirrose ou câncer de fígado, em decorrência da ligação irreversível dos metabólitos de aflatoxina a resíduos de DNA, resultando em mutações de grande impacto (ENGIN; ENGIN, 2019).

Existem algumas espécies conhecidas por serem virulentas, como *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. flavus* e *A. terreus*. Enquanto a grande maioria das espécies do gênero é considerada como não virulenta, sendo raramente encontradas em casos médicos, *A. fumigatus* é responsável por cerca de 90% dos casos de infecções. (HUBKA et al., 2018; KOCSUBÉ et al., 2016; SAMSON et al., 2007; STEENWYK et al., 2019).

1.2. Casos clínicos relacionados ao gênero *Aspergillus*

Coletivamente, o gênero *Aspergillus* afeta milhões de seres humanos, apresentando altas taxas de infecções fatais todos os anos (BONGOMIN et al., 2017; DENNING, 2017). Espécies desse gênero produzem esporos assexuais, que devido às proteínas hidrofobinas em sua superfície, podem ser carregados pelo vento, fazendo com que estejam presentes no ar, tanto em ambientes fechados, como abertos, em concentrações que podem variar de 1 a 100 esporos por m³, podendo chegar a 10⁸ esporos por m³ em certos tipos de ambientes (WÉRY, 2014). As infecções são causadas por esses esporos podem causar uma variedade de reações alérgicas e doenças infecciosas, a depender da situação imunológica do hospedeiro (LATGÉ, 1999; LATGÉ; CHAMILOS, 2019). Em indivíduos saudáveis, os esporos são eliminados rapidamente por células epiteliais ciliadas, pelas substâncias secretadas por essas células epiteliais, macrófagos e neutrófilos alveolares (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013).

Portanto, pode-se dizer que existe um amplo espectro de espécies com diversas características no gênero *Aspergillus*, podendo ser consideradas patogênicas ou não. Ao analisar filogeneticamente esse gênero, nota-se que a capacidade de virulência possui origens em diversos momentos da evolução do grupo, indicando o aparecimento desse caractere em diversos pontos da evolução do gênero *Aspergillus*, sendo a espécie *A. fumigatus* a espécie predominante na maioria dos casos (HUBKA et al., 2018; STEENWYK et al., 2019).

Células epiteliais do hospedeiro secretam compostos antimicrobianos solúveis, os quais tem um papel fundamental na defesa das vias aéreas (ALEKSEEVA et al., 2009), incluindo também citocinas e quimosinas responsáveis por iniciar a ativação da resposta pró-inflamatória (BELLANGER et al., 2009). Em geral, as proteínas e metabólitos da superfície dos conídios contribuem tanto para a dispersão das células fúngicas, como para a evasão do sistema imune, além de também mediar a aderência dos esporos às células presentes no tecido epitelial do hospedeiro (VOLTERSEN et al., 2018).

Os conídios assexuais, quando não são prontamente eliminados após o contato com as substâncias presentes no epitélio pulmonar, passam por um processo de entumescimento celular, rompendo a camada hidrofóbica e expondo os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs), como as moléculas β -1,3-glucano, α -glucano, galactomanana e quitina (ABAD et al., 2010; DAGENAIS; KELLER, 2009). O reconhecimento dos PMAPs pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs ou RRP) do hospedeiro leva à ativação de macrófagos alveolares, desencadeando fortes respostas inflamatórias no local da infecção (IBRAHIM-GRANET et al., 2003), fagocitose de conídios inchados, acidificação de fagolisossomos e espécies reativas de oxigênio (EROs) dos macrófagos para matar os invasores. Esporos não fagocitados germinam após 4 a 6 horas nos pulmões, tornando-se alvos também de neutrófilos, que similarmente aos macrófagos, utilizam EROs para matar as hifas, ou podem grudar-se a elas, liberando grânulos que contém uma variedade de compostos antimicrobianos, como proteases, defensinas, lisossomos e lactoferrina (NAUSEEF, 2007; VAN DE VEERDONK et al., 2017), responsáveis por gerar estresses diversos, danos à integridade e escassez de nutrientes fundamentais para a sobrevivência das células de *Aspergillus*.

As diversas doenças causadas por *Aspergillus spp.* em humanos, podem ser classificadas em três grupos, a depender das reações do sistema imune do hospedeiro, mecanismos patogênicos manifestados e manifestações clínicas, baseando-se em seu grau de seriedade e importância (KOSMIDIS; DENNING, 2015; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; VAN DE VEERDONK et al., 2017). Em pacientes saudáveis com lesões pulmonares prévias, formas crônicas não invasivas de infecção por *Aspergillus spp.*, com características comuns entre si, podem variar de aspergiloma até quadros de aspergilose

crônica pulmonar (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2018a; DENNING, 2017; MOODLEY; PILLAY; DHEDA, 2014). O aspergiloma caracteriza-se por uma colonização saprofítica da cavidade parenquimal pulmonar por *Aspergillus* e consiste tanto em elementos vivos e mortos do micélio fúngico, células inflamatórias, fibrina, muco e componentes de sangue e epitélio degenerado. A massa micelial pode se depositar livre dentro da cavidade, ou estar aderida à parede da cavidade pulmonar através de um tecido de granuloma/inflamatório. Esse processo pode causar bloqueio de vasos sanguíneos, causando hemoptise severa (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2018b; DENNING, 2017; MOODLEY; PILLAY; DHEDA, 2014; PATTERSON et al., 2016; TAKAZONO; IZUMIKAWA, 2018).

A forma mais severa de aspergilose entre pacientes com sintomas atópicos é a aspergilose bronco-pulmonar alérgica (ABPA) (AGARWAL et al., 2013), a qual se desenvolve após sensibilização aos compostos alérgenos em pacientes com fibrose cística (PRICE et al., 2015), ou indivíduos com predisposições genéticas para ABPA (AGARWAL et al., 2013; KOSMIDIS; DENNING, 2015; VACHER; NICULITA-HIRZEL; ROGER, 2015). ABPA é uma doença causada pela hiper sensibilidade do pulmão, geralmente devido à espécie *A. fumigatus*, sendo que quase todos os pacientes com ABPA, apresentam histórico de asma crônica. Clinicamente, sintomas da ABPA incluem chiado no peito, mal-estar, febre e tosse leves e crônica, escarro contendo muco marrom, coágulos e dor no peito. Conforme ABPA progride, o inchaço nos brônquios (bronquiectasia) torna-se um sintoma dominante da doença, e pode resultar em secreção pulmonar crônica, e ocasionalmente, tosse com sangue (hemoptise), assim como anormalidades em exames radiográficos (raio-x). Em pacientes com fibrose cística, um sintoma característico da ABPA é a hemoptise, que pode se complicar causando colapso pulmonar, devido à um pneumotórax (AGARWAL et al., 2013; DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013; PATTERSON et al., 2016; UEKI et al., 2018).

Em pacientes severamente imunocomprometidos, a colonização do epitélio pulmonar por *A. fumigatus* pode avançar para outros órgãos em sequência, gerando uma condição denominada aspergilose pulmonar invasiva (API). Essa é a forma mais grave da doença, acometendo principalmente

pacientes incluídos em grupos de risco, tais como aqueles submetidos aos tratamentos que debilitam o sistema imune, como a administração de imunossupressores (quimioterapia). Neste grupo enquadram-se pacientes com tumores malignos e transplantados, por exemplo. Neste cenário, cerca de 50% dos casos de API acometem pacientes com leucemia ou receptores de medula óssea, e neste grupo a taxa de mortalidade pode chegar a 90%, dependendo do quadro clínico (GUPTA et al., 2011; IMBERT et al., 2021; KONTOYIANNIS et al., 2010; PERLIN, 2015; SEGAL, 2009).

1.3. A seção *Fumigati* e a evolução da virulência

Durante o decorrer dos últimos anos, a taxonomia das espécies que compõem gênero *Aspergillus* mudou bastante, com a utilização de novas metodologias, adicionando maiores níveis de detalhamento nas análises, o que acabou levando a utilização de um novo conceito, o das chamadas “espécies crípticas”. Essa mudança tornou possível classificar de forma mais apurada, espécies morfológicamente indistinguíveis, as quais foram agrupadas em uma mesma “seção” taxonômica. Estudos recentes sobre a taxonomia do grupo, relatam 436 espécies de *Aspergillus*, distribuídas dentro de 27 seções (HOUBRAKEN et al., 2020). A presença de um número maior de espécies crípticas de *Aspergillus* tem aumentado em amostras clínicas nos últimos anos, indicando mudanças na epidemiologia em casos de aspergilose (GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016). Atualmente, mais de 100 espécies já foram reportadas em amostras clínicas, incluindo 30 espécies relacionadas a casos de AIP (TSANG et al., 2018).

Para além do interesse taxonômico, a noção de espécies crípticas é de grande interesse, dado que permite traçar relações entre as espécies, e seus respectivos níveis de susceptibilidade a drogas, por exemplo, já foi demonstrado um campo de promissor para pesquisa em diversas seções (ALASTRUEY-IZQUIERDO; ALCAZAR-FUOLI; CUENCA-ESTRELLA, 2014; IMBERT et al., 2020). A espécie *A. fumigatus*, a mais frequentemente identificada em casos de aspergilose, foi classificada dentro da seção batizada *Fumigati*, composta por cerca de 50 espécies do gênero *Aspergillus*, sendo poucas patogênicas (HUBKA et al., 2018; LAMOTH, 2016; SUGUI et al., 2014). Dado que, em termos taxonômicos, a definição de seção refere-se a uma

classificação entre gênero e espécie, uma análise filogenética da distribuição de espécies patogênicas e não patogênicas nesta seção sugere que a patogenicidade destas espécies que acometem o hospedeiro humano evoluiu múltiplas vezes, e de maneira independente ao longo da evolução do grupo (HUBKA et al., 2018; SUGUI et al., 2014). Existem espécies da seção *Fumigati* em que ainda não foram observadas formas de reprodução sexuada. Espécies capazes de realizar reprodução sexuada eram antigamente classificadas como *Neosartorya*, e a partir da proposta elaborada por Samson et al. (2014), todas as espécies da seção passaram a ser classificadas dentro do gênero *Aspergillus*, sendo *A. fumigatus* a espécie mais comumente encontrada nos mais diversos ambientes. (SAMSON et al., 2007; STEENWYK et al., 2019; SUGUI et al., 2014).

Enquanto *A. fumigatus* infecta mais de 200 mil pessoas anualmente, *A. fischeri*, um fungo evolutivamente próximo à *A. fumigatus*, cujo transcriptoma apresenta aproximadamente 95% de similaridade com *A. fumigatus*, raramente é reportado como agente causador de doenças e, portanto, não é clinicamente relevante (BALAJEE et al., 2009; FEDOROVA et al., 2008). Da mesma forma, a espécie *A. thermomutatus* responde por aproximadamente 1% das infecções causadas por organismos da seção *Fumigati* ao passo que *A. turcosus* (filogeneticamente relacionado à *A. thermomutatus*- 89% de similaridade proteômica) foi isolado de apenas quatro pacientes no Canadá (PARENT-MICHAUD et al., 2019) e não é considerado clinicamente relevante.

Como já citado, espécies dessa seção também são consideradas importantes na indústria de alimentos, devido à capacidade de causar deterioração de alimentos e graves intoxicações em humanos (SAMSON; CENTRE, 2010). Um dos exemplos é a espécie *A. fischeri* (*Neosartorya fischeri*), com alguns relatos de cepas termotolerantes e resistentes à pasteurização industrial (HOUBRAKEN; DYER, 2015). Com o objetivo de investigar melhor aspectos relacionados à virulência, epidemiologia, e aplicações na indústria, *A. fischeri* e *A. fumigatus* estavam entre as primeiras espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* a ter os genomas sequenciados (FEDOROVA et al., 2008).

Durante a última década, a incidência de cepas de *A. fumigatus* resistentes a azóis tem crescido consideravelmente (SNELDERS et al., 2008).

Estudos conduzidos na Alemanha (BADER et al., 2015) encontraram, a partir de amostras de solo, duas colônias visualmente parecidas com *A. fumigatus*, porém não foi possível identificá-las em análises de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) utilizadas nesse estudo. Após análises de sequenciamento de regiões de íntrons (ITS), verificou-se que ambas as colônias pertenciam à seção *Fumigati*, porém não foram encontradas correspondências de similaridade com nenhuma outra espécie do gênero *Aspergillus* (HOUBRAKEN et al., 2015). Utilizando uma abordagem polifásica, combinando dados de sequenciamento, de β -tubulina (*BenA*) e calmodulina (*CaM*), características de macro e micro morfologia e dados relacionando temperatura-crescimento, mostrou que ambos os isolados eram representantes de uma espécie até então não descrita na literatura, propondo então o nome *A. oerlinghausenensis* (HOUBRAKEN et al., 2015).

Por sua vez, a espécie *A. lentulus*, foi descrita em 2005, relatada em um caso de aspergilose em humanos (BALAJEE et al., 2009). Em um estudo recente, (DOS SANTOS et al., 2020), foram relatadas diferenças quanto à resistência a drogas antifúngicas e sequência genética de cinco cepas das espécies *A. lentulus*, *A. fumigatus* e *Aspergillus fumigati* *affinis*, indicando que os níveis de resistência a drogas antifúngicas podem variar bastante entre as diferentes cepas de cada espécie, encontrando cepas mais sensíveis e mais resistentes a diferentes concentrações testadas. A busca por um melhor entendimento das características relevantes para patogenicidade entre diferentes cepas das espécies do gênero *Aspergillus*, responsáveis pela grande maioria dos casos de aspergilose em humanos podem trazer avanços significativos para um melhor entendimento dos genes e vias metabólicas mais importantes para a virulência, bem como os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência a drogas antifúngicas (DOS SANTOS et al., 2020; STEENWYK et al., 2019).

As diferenças na patogenicidade não parecem estar diretamente relacionadas à ecologia das várias espécies de *Aspergillus*, já que espécies patogênicas podem ser isoladas em ambientes com as mais variadas características, não sendo tão comuns e nem tão frequentes quanto esperado em ambientes hospitalares, ao passo que espécies não patogênicas, como *A. fischeri*, são comumente isoladas em diversos ambientes, incluindo hospitais

(FRAÇ; JEZIERSKA-TYS; YAGUCHI, 2015; HONG et al., 2010; KLICH, 2002; TONG et al., 2017). Estudos anteriores a respeito de *A. fumigatus* demonstraram que muitos dos genes envolvidos com maior virulência da espécie estão também relacionados com processos também relacionados com a sua versatilidade em habitar os mais diversos e variados ambientes, enfrentando frequentes mudanças geradoras de estresse para o organismo, exigindo uma resposta, como pode ser observado nos casos do estresse térmico, mudanças de pH, luminosidade e concentrações de O₂ por exemplo (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021). Para fins comparativos, o presente estudo utilizou as espécies *A. fumigatus*, *A. oerlinghausenensis*, *A. fischeri* e *A. lentulus* para buscar possíveis explicações para a maior virulência de *A. fumigatus*.

1.4. Principais mecanismos envolvidos na progressão da API

Pela maior relevância clínica, diversos estudos lançam olhares para a espécie *A. fumigatus* e para as possíveis explicações por trás de sua maior virulência, com o intuito de compreender quais são os elementos genéticos, moleculares e bioquímicos envolvidos na maior patogenicidade observada nessa espécie. Vários desses estudos apontam que o processo de seleção de genes, proporcionado pelas altas temperaturas atingidas em grandes massas de material orgânico em decomposição, contribuíram para essa grande capacidade de *A. fumigatus* de se adaptar, não só a ambientes mais quentes, como também a condições variáveis de pH, disponibilidade de nutrientes e diferentes relações com a microbiota de maneira geral (BASTOS et al., 2022; HUBKA et al., 2018; STEENWYK et al., 2019; WAGENER et al., 2008).

Durante o processo de infecção, assim como em certas condições encontradas no meio ambiente, o patógeno também se depara com diversos estresses, como defesas do sistema imunológico (mesmo em hospedeiros imunocomprometidos com sistema imune fragilizado), mudanças nas concentrações de O₂ e CO₂, pH, temperatura, estresse oxidativo, limitação de nutrientes, como ferro, zinco, cálcio e magnésio. Esses estresses são sentidos pelos receptores celulares do fungo, os quais são responsáveis por disparar sinais que partem da superfície das células. Esses sinais são então transmitidos através de cascatas de sinalização enzimática até o núcleo, onde

podem ser ativadas diferentes classes de proteínas, conhecidas como fatores de transcrição (FTs), ou repressores (ABAD et al., 2010; BULTMAN; KOWALSKI; CRAMER, 2017; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; NIERMAN et al., 2005).

Os FTs ou repressores são responsáveis por ativar ou reprimir, respectivamente, a transcrição de uma série de outros genes e/ou enzimas, cujos impactos serão responsáveis pela reorganização celular e reprogramação metabólica das células, evitando o desperdício de energia e mantendo ativas somente as vias fundamentais para a sobrevivência das células fúngicas em determinada condição, resultando assim em mecanismos de adaptação aos diferentes estresses impostos pelo organismo hospedeiro e/ou ambiente, promovendo, portanto, a sobrevivência do organismo durante o processo de colonização dos mais variados ambientes (BULTMAN; KOWALSKI; CRAMER, 2017; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; NIERMAN et al., 2005).

Portanto, os mecanismos envolvidos na resposta a estresses são compostos de interações genéticas complexas, permitindo que um único fator de transcrição seja responsável pela regulação de diversos genes e/ou vias metabólicas essenciais para a patogenicidade, assim como a ausência ou o bloqueio de um único fator de transcrição pode desregular toda uma rede de genes previamente adaptada que permitiria a sobrevivência do fungo em um determinado ambiente (BULTMAN; KOWALSKI; CRAMER, 2017). Respostas desencadeadas por diversos estresses ambientais envolvem produção de componentes específicos, como por exemplo, aqueles ligados à síntese de componentes da estrutura da parede celular, matriz extracelular, biofilme e metabólitos secundários (MSs).

Esses mecanismos mencionados são considerados como importantes para o estabelecimento da infecção por *A. fumigatus* por aumentarem sua resistência contra os mecanismos da imunidade inata, além de aumentar a capacidade dessa espécie de causar dano e sobreviver no tecido de hospedeiros (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; NIERMAN et al., 2005; PEREZ-CUESTA et al., 2021). Todos os fatores citados, quando somados, contribuem para a patogenicidade, além de também influenciarem no desenvolvimento de mecanismos de resistência a drogas, característica

fundamental para fungos patogênicos. (BIGNELL et al., 2016; JEANVOINE et al., 2017; MANFIOLLI et al., 2018; RAFFA; KELLER, 2019). Portanto, pode-se dizer que *A. fumigatus* é um fungo patogênico e oportunista, que devido à versatilidade e resistência a diversos estresses ambientais, desenvolveu também a capacidade de ser um patógeno de diversos organismos, incluindo seres humanos (LATGÉ; CHAMILOS, 2019). Danos epiteliais pré-existentes podem favorecer a fixação e germinação no epitélio pulmonar, sendo que ambos esporos e hifas são capazes de produzir e secretar compostos formadores de biofilme, MSs e proteases capazes de causar dano epitelial e modular resposta imune, facilitando no estabelecimento da infecção e na evasão das defesas do hospedeiro (HAGAG et al., 2012). A seguir, serão descritos alguns caracteres considerados como importantes para a virulência de *A. fumigatus*.

1.4.1. Matriz extracelular, biofilme, proteínas estruturais e MSs

Em casos em que o hospedeiro possui um sistema imune fragilizado, os esporos conseguem germinar, gerando hifas. Conforme crescem, as hifas se aglomeram e produzem uma matriz extracelular (MEC) responsável por formar biofilme, cujo principal componente é o polissacarídeo galactosamina-galactano (GAG). GAG é produzido e secretado constantemente pelas hifas, sendo extremamente importante para evitar o reconhecimento dos PMAPs fúngicos pelas células do sistema imune do hospedeiro, como macrófagos e neutrófilos, gerando um efeito altamente imuno modulatório. A MEC de biofilme fúngico é composta também de outras classes de macromoléculas além dos polissacarídeos, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. (CEGELSKI, 2015; MARTINS et al., 2010; ZARNOWSKI et al., 2014). A formação de biofilme também tem um papel crucial, na adesão celular ao epitélio, processo considerado essencial para a sobrevivência no hospedeiro (BEAUVAIS et al., 2014). A produção dos compostos relacionados com a formação de biofilme já foi diversas vezes relacionada com uma maior resistência a tratamentos com equinocandinas observada em *A. fumigatus*. Esses mecanismos de produção de MEC normalmente são associados com as vias das MAPKs envolvendo a biossíntese de componentes da parede celular, bem como as vias envolvidas

na manutenção da estrutura da parede celular (BOM et al., 2015; KERKAERT et al., 2022; MANFIOLLI et al., 2018).

Também é importante destacar as defesas presentes unicamente nos esporos assexuais, dado que são o primeiro ponto de contato do fungo com o hospedeiro. Por exemplo, a proteína RodA, uma hidrofobina, forma uma camada proteica em torno de conídios dormentes e, além de auxiliar a dispersão de esporos pela corrente de ar, dificulta o reconhecimento fúngico pelas células do sistema imune do hospedeiro, favorecendo assim a sobrevivência do patógeno (AIMANIANDA et al., 2009; DE JESUS CARRION et al., 2019; VALSECCHI et al., 2020). A proteína CcpA, também presente em conídios, foi recentemente caracterizada e demonstrou ser importante para a virulência de *A. fumigatus*, atuando via inibição do reconhecimento do sistema imune inato e dificultando o acesso aos PMAPs (VOLTERSEN et al., 2018). O pigmento melanina, também é um importante componente da parede celular dos conídios de *A. fumigatus*. Além de proteger os conídios contra danos causados pelas radiações UV, as moléculas de melanina também podem neutralizar partículas de EROs produzidas por macrófagos, diminuindo a acidez nos fagolisossomos e, conseqüentemente, a efetividade dessas células em matar (JACKSON; HIGGINS; LIN, 2009).

A versatilidade de *A. fumigatus* e a capacidade de suas hifas de reorganizarem a parede celular também é um importante aspecto que contribui com sua maior relevância clínica. Um exemplo importante pode ser observado em tratamentos com drogas antifúngicas, como por exemplo a caspofungina (CSP). Quando presente em altas concentrações, a CSP gera desaceleração do crescimento fúngico, hiper ramificação das hifas e ocasional lise dos compartimentos apicais das hifas. Como resposta, *A. fumigatus* é capaz de se adaptar e transferir as enzimas 1,3- β -D-glucano sintase dos compartimentos afetados para vacúolos, fazendo com que essas enzimas, e conseqüentemente as moléculas que elas sintetizam, desapareçam da parede celular. Após aproximadamente 2 a 3 dias de adaptação, novas hifas começam a apresentar crescimento paradoxal, em um efeito conhecido como efeito paradoxal da caspofungina (CPE) (ZHAO et al., 2022).

Durante o CPE, *A. fumigatus* é capaz de crescer a partir de microcolonias desprovidas de β -1,3 glucano e β -D-glucano. Essas hifas são

caracterizadas por crescimento rápido, morfologia normal, nova localização celular das enzimas 1,3- β -D-glucano sintase e β 1,3-glucano sintase, o que conseqüentemente retoma a produção de β -1,3 glucano e β -D-glucano, bem como normalização dos níveis de quitina presentes na parede celular (COLABARDINI et al., 2022; WAGENER; LOIKO, 2018). Os mecanismos genéticos e moleculares responsáveis por esse fenômeno ainda são desconhecidos, com algumas evidências apontando para as vias de integridade da parede celular reguladas pela *MpkA* e *RlmA* como responsáveis por regular esses fenótipos observados (COLABARDINI et al., 2022).

De forma resumida, pode-se dizer que CPE está associado à modificações na parede celular em termos de estruturação e quantidade relativa de cada componente. Após a exposição de grandes concentrações de CSP, podem ser observados alguns fenótipos marcantes, como aumentos drásticos na quantidade de quitina, desaparecimento de β -1,3-glucano, bem como podem ser observadas mudanças na morfologia e crescimento dos fungos (STEINBACH; LAMOTH; JUVVADI, 2015; WAGENER; LOIKO, 2018). As vias de sinalização de cálcio-calcinerina, Hsp90 e certas proteínas quinase ativadas por mitogênio (MAPKs) parecem desempenhar um papel importante na regulação dessas mudanças estruturais e conformacionais, permitindo a maior resistência observada na espécie *A. fumigatus* (ALTWASSER et al., 2015; JUVVADI; STEINBACH, 2015; LAMOTH et al., 2014; RIES et al., 2017).

Com relação aos MSs, pode-se dizer que são moléculas bioativas e não diretamente envolvidas com o crescimento e desenvolvimento do organismo, sendo mais importantes em termos de melhoras de longo prazo, em relação à adaptabilidade e sobrevivência do organismo em condições extremas (Myers et al., 2017). Isso acontece porque durante a patogênese, alguns metabólitos são responsáveis por combater o sistema imune e promover a aquisição de nutrientes e cofatores enzimáticos essenciais (LIND et al., 2017). Também deve ser destacado que as hifas e conídios são capazes de produzir MSs diversos. Alguns são importantes por possuírem a função de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias (GRESNIGT et al., 2014), reduzindo assim as respostas inflamatórias geradas pelo sistema imune.

Um bom exemplo é a gliotoxina, um metabólito secundário considerado um dos principais fatores de virulência relacionados a *A. fumigatus* já

identificado, o qual inibe fortemente o sistema mucociliar, interferindo também no processo de fagocitose de macrófagos, a proliferação e citotoxicidade de células T (KWON-CHUNG; SUGUI, 2009). A secreção de MSs, como a gliotoxina, ou a tripacidina também variam de acordo com a temperatura de cultivo (LIND et al., 2017), indicando que há um papel importante da temperatura envolvendo a regulação da produção e secreção desses compostos

1.4.2. Metabolismo dos macronutrientes, carbono e nitrogênio

Os tecidos infectados por *A. fumigatus* não possuem uma grande quantidade de nutrientes facilmente assimiláveis, o que dificulta a obtenção de compostos orgânicos, cátions e metais essenciais para o crescimento fúngico. Portanto, para poder ter acesso a esses nutrientes, ambos os esporos e hifas, devem ser capazes de produzir proteases, enzimas diversas, e moléculas carreadoras, responsáveis por digerir as macromoléculas presentes no epitélio, e posteriormente, captar os componentes orgânicos digeridos (DE VRIES; VISSER, 2001; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021).

Para exemplificar a importância dessas vias secundárias, foram feitos estudos com cepas mutantes com fatores de transcrição CreA ou AreA deletados. Em *A. fumigatus*, a repressão do catabolismo de carbono (RCC) é um processo celular que direciona o metabolismo de carbono para a utilização da principal fonte de carbono disponível no ambiente. RCC é responsável por reprimir o uso de fontes menos favoráveis de carbono quando há alguma fonte mais facilmente assimilável disponível.

A glicose é a fonte preferencial de carbono para a maioria dos microrganismos, devido à sua fácil assimilação e metabolização pelo organismo, gerando crescimento rápido. Em *A. nidulans* a RCC é mediada pelo fator de transcrição CreA, uma proteína que se liga ao DNA através de um domínio C₂H₂, resultando na repressão dos genes necessários para a utilização de fontes alternativas de carbono, como o acetato, quando há glicose no ambiente (ADNAN et al., 2018).

Já com relação ao metabolismo de nitrogênio, as numerosas vias e fatores de transcrição envolvidos, tornam seu estudo um grande desafio. O gene *AreA* é um fator de transcrição que está principalmente envolvido na via

de repressão de metabólitos de nitrogênio (RMN). A principal função da RMN é a priorização do uso de formas facilmente assimiláveis de nitrogênio, sendo *AreA*, o principal gene atuante na regulação dessa via, responsável por regular o catabolismo de nitrogênio seguindo esse princípio (HYNES et al., 2011). Esse fator de transcrição também está envolvido em quase todas as vias de assimilação de carbono, visto que cepas mutantes Δ *AreA* a expressão de muitos genes responsáveis pelo catabolismo de nitrogênio é afetada, como por exemplo os genes *amdS* (REIS et al., 2013) e *fmdS* (CHILDERS et al., 2016) para amidas, *gdhA* (RAFFA; KELLER, 2019) para amônia, *hxA*, *uaZ* e *uapA* (BIGNELL et al., 2016; TOMODA et al., 1996) para purinas e *crnA* e *niaD* (ALBRECHT et al., 2010) para nitrato. Conseqüentemente, esse mutante Δ *AreA* só é capaz de utilizar amônia ou glutamina como fonte de nitrogênio. Não obstante, a deleção desses fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão de enzimas envolvidas na aquisição de carbono (*CreA*) e nitrogênio (*AreA*), geraram fenótipos de menor virulência em experimentos de aspergilose com camundongos para ambos os genes (HENSEL et al., 1998; RIES et al., 2016).

1.4.3. Metabolismo dos micronutrientes, ferro, cálcio e zinco

Ferro, cálcio e zinco também desempenham papéis fundamentais em diversas reações celulares, tanto em células do hospedeiro, como de patógenos. Portanto, a habilidade de sequestrar esses íons do hospedeiro propicia uma vantagem competitiva para *A. fumigatus* (HAAS, 2014; PEREZ-CUESTA et al., 2021).

Ferro é um metal, e o elemento traço mais abundante em diversos organismos, sendo um cofator indispensável para muitos processos metabólicos essenciais na manutenção do organismo, como a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, metabolismo de aminoácidos, síntese de DNA, formação de esteróis e processos de desintoxicação para lidar com estresses oxidativos (ANDREINI et al., 2008; GERWIEN et al., 2018; HAAS, 2012).

A presença e disponibilidade desse metal no ambiente dependem do tipo de atmosfera e do pH, sendo o pH o fator mais determinante na solubilidade de íons de ferro, visto que é um metal solúvel em condições de pH

ácido e na presença de O₂, tendendo a precipitar em condições de pH neutro e alcalino. Assim como outros fungos e bactérias, *A. fumigatus* podem obter ferro e manter a sua homeostase dentro das células fúngicas de diferentes formas (BUNNEY et al., 2017; WALLNER et al., 2009). O equilíbrio constante e variável entre consumo e estocagem de ferro é crucial para a manutenção das células e sobrevivência do fungo (HAAS, 2012).

As diferentes formas de ferro presentes no ambiente demandam estratégias diversas para obtenção desse composto essencial. Especificamente, *A. fumigatus* conta com dois mecanismos de alta afinidade por íons ferro, sendo eles a assimilação via redução de íons ferro, e a absorção mediada por sideróforos (SCHRETTL et al., 2004), e ainda um sistema de baixa afinidade aos íons ferro, conduzido por permeases de metal genéricas (KAPLAN; KAPLAN, 2009). Esse processo de aquisição começa com uma enzima metal redutase de membrana que reduz um íon Fe³⁺ para a sua forma solúvel Fe²⁺, e então a ferroxidase FetC o re-oxida para permitir o transporte através da permease de ferro FtrA (SCHRETTL et al., 2004).

Já os sideróforos são divididos em duas classes, sendo os sideróforos extracelulares os responsáveis pela obtenção de ferro e sua homeostase, como a fusarinina C e triacetilfusarinina C, enquanto sideróforos intracelulares, ferricrocina e hidroferricrocina são responsáveis pela homeostase do ferro e armazenamento nas células do organismo (SCHRETTL et al., 2008).

Também é importante salientar que *A. fumigatus* precisa se adaptar a condições neutras e alcalinas, como o pH fisiológico do epitélio pulmonar. Como já discutido, pH é o principal fator determinante na solubilidade dos íons de ferro, e os ambientes neutros para alcalinos do epitélio pulmonar diminuem drasticamente os níveis de ferro disponível (LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021). O fator de transcrição PacC é responsável por reprimir genes expressos em condições de pH ácido, sendo também responsável por ativar a transcrição de genes relacionados à adaptação a ambientes alcalinos, induzindo a produção de sideróforos necessários para obtenção de ferro e, conseqüentemente, permitindo a sobrevivência no epitélio pulmonar, e conseqüentemente, a maior virulência observada em *A. fumigatus* (BERTUZZI et al., 2014; BIGNELL et al., 2005).

Cálcio também é um íon crítico para sinalização intracelular e diversas vias celulares, e assim sendo, a homeostase de cálcio também é regulada por uma grande gama de canais de cálcio, bombas de cálcio e transportadores de cálcio (BROWN; GOLDMAN, 2016; JUVVADI; STEINBACH, 2015). O cálcio, portanto, participa da regulação da maioria dos processos que controlam o crescimento e a morfogênese no fungo (ESPESO, 2016). O sistema de sinalização baseado em cálcio é capaz de mudar a concentração de cálcio livre no citoplasma em resposta aos estímulos externos, especialmente em resposta às flutuações de concentração de cálcio dentro dos fagolisossomos, durante a infecção (KYRMIZI et al., 2018). O metabolismo de cálcio é controlado por uma série de recursos bioquímicos organizados em sequência, envolvendo os já mencionados canais, bombas, transportadores e proteínas ligantes à cálcio.

Canais de cálcio de alta afinidade acoplados à membrana, Cch1 e Mid1 já foram caracterizados (DE CASTRO et al., 2014). O vacúolo fúngico serve como o principal compartimento de estocagem de cálcio, juntamente com o retículo endoplasmático, o aparato de Golgi e as mitocôndrias. Existe comunicação direta entre as diferentes organelas de estocagem. O canal de cálcio vacuolar YvcA, ATPases vacuolares de Ca^{2+} PmcA, PmcB e PmcC, a ATPase de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ localizada no aparato de golgi PmrA, o unimportador mitocondrial de Ca^{2+} MucA, e a proteína carreadora mitocondrial AgcA, já foram todos identificados como extremamente importantes no equilíbrio celular de cálcio em *A. fumigatus* (DINAMARCO et al., 2012a; PINCHAI et al., 2010; SONG et al., 2016).

Deleções dos genes codificadores para esses transportadores geralmente afetam o crescimento vegetativo das hifas, aumentam a susceptibilidade à agentes oxidantes, azóis e drogas perturbadoras da integridade da parede celular, processos de homeostase de cálcio em geral, integridade da parede celular, localização dos septos nas hifas e virulência, o que também define o cálcio como tendo um papel fundamental na biologia de *A. fumigatus*. Os mecanismos de transdução de sinal via Ca^{2+} também já foram analisados, e definidos como similares àqueles encontrados em outros sistemas fúngicos que classicamente envolvem a proteína ligante a cálcio, calmodulina, a calcineurina fosfatase de serina/treonina e o fator de transcrição CrzA. Um mutante ΔCrzA não é capaz de germinar devido a problemas de

integridade na parede celular e capacidade de virulência, o que confirma novamente os papéis essenciais desempenhados pelo cálcio no metabolismo, e conseqüentemente na virulência, de *A. fumigatus* (CRAMER et al., 2008; JUVVADI et al., 2013, 2015, 2016, 2011; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; SORIANI et al., 2008).

Há também mecanismos para aquisição de zinco, mediada pelos transportadores de zinco, ZrfA, ZrfB e ZrfC, que são controlados pelo fator de transcrição ZafA (MORENO et al., 2007). Os genes envolvidos na aquisição de zinco, são de suma importância para a virulência, visto que são regulados de acordo com as mudanças de pH do ambiente. A expressão do gene *zrfC* é fundamental para sobrevivência em condições de pH neutro e alcalino, condições também encontradas no epitélio pulmonar, condição que não só dificulta a obtenção de íons de ferro, como também limita a disponibilidade de íons zinco (PEREZ-CUESTA et al., 2021). Testes *in vivo* realizados com cepas mutantes $\Delta zrfC$ comprovam essa teoria, onde a cepa teve seus níveis de virulência reduzidos em modelo leucopênico e não leucopênico de infecção em camundongos (AMICH et al., 2014), enquanto o mutante duplo $\Delta zrfAB$ apresentou níveis de virulência semelhantes aos da cepa selvagem (AMICH et al., 2014; MORENO et al., 2007). Cepas $\Delta zafA$ também são avirulentas, dado que esse gene é o principal regulador de todos os genes da família *zrf*, o que também é válido para a cepa triplo mutante $\Delta zrfABC$ (AMICH et al., 2014; MORENO et al., 2007). *zrfC* é a única proteína dos genes *zrf* que possui uma incomum longa N-terminação localizada para o lado de extracelular da membrana, permitindo a obtenção de Zn diretamente dos pulmões (AMICH et al., 2014), tornando *A. fumigatus* uma espécie resistente à calprotectina, visto que a cepa $\Delta zrfC$ apresenta um comprometimento no crescimento quando essa proteína de defesa de hospedeiros está presente no meio (AMICH et al., 2014). Conseqüentemente, os genes de *A. fumigatus* envolvidos no metabolismo do Zn, que é um nutriente essencial, podem ser bons alvos para estudos terapêuticos, especialmente os genes *zrfC* e *zafA*, os quais não possuem nenhum ortólogo em seres humanos, e são fundamentais para gerar infecção fúngica (PEREZ-CUESTA et al., 2021).

De maneira geral, a aquisição de nutrientes é parte do metabolismo primário de *A. fumigatus*, e que por sua vez, é a fonte de precursores para o

metabolismo secundário. Um exemplo é o gene *areA*, já discutido anteriormente, responsável por exercer funções regulatórias no metabolismo de nitrogênio, e que também é responsável por modular a produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus* (FASOYIN et al., 2019). Portanto, devido a todos os motivos supracitados, seria extremamente interessante determinar as interconexões entre metabolismo primário e secundário. Tais interações provavelmente acontecem ao nível de regulação gênica, tendo em vista que os sinais das vias dos sistemas globais de detecção, das TOR e MAP kinases estão implicados na detecção de nitrogênio, atuando sobre *HapX* e regulando a produção de sideróforos (BALDIN et al., 2015). Evidências dessa interconexão já foram descobertas em *Fusarium fujikuroi*, onde TOR kinases controlam, parcialmente via *AreA*, os genes responsáveis pela biossíntese do composto bikaverina (TEICHERT et al., 2006).

Além disso *A. fumigatus* produz mais gliotoxina em ambientes onde há limitação de zinco, e mutantes com o gene *zafA* deletado são incapazes de produzir gliotoxina (SEO et al., 2019). Os mecanismos regulatórios da biossíntese de gliotoxina por meio de zinco foram descritos recentemente, e correspondem aos processos que ocorrem durante a infecção. As baixas concentrações de zinco aumentam a expressão do gene *zafA*, que além de aumentar a expressão de genes relacionados com a aquisição e metabolismo de zinco, também aumentam a expressão de genes relacionados à via de biossíntese da gliotoxina, através da ativação do gene *GliZ* (SEO et al., 2019). A associação entre baixas concentrações de zinco e a produção da toxina, juntamente com a regulação de outros metabolismos, como de aquisição de ferro, cálcio, nitrogênio e carbono, poderiam explicar o sucesso por trás da resposta de *A. fumigatus* à escassez de nutrientes e a atividade da imunidade inata do hospedeiro.

1.4.4. Adaptações à falta de oxigênio

Oxigênio também é essencial para *A. fumigatus* em seus processos de crescimento e patogênese (LATGÉ; CHAMILOS, 2019). O fungo pode encontrar baixas concentrações de oxigênio, geralmente devido à ativação contínua de respostas inflamatórias, que somado aos danos causados nos vasos sanguíneos no local de infecção, geram escassez de oxigênio disponível

(GRAHL et al., 2012; PEREZ-CUESTA et al., 2021). A proteína SrbA, é crucial para a biossíntese de esteróis formadores das membranas celulares e vesículas, também está relacionada à maior sobrevivência sob condições de hipóxia, ambientes com escassez de ferro, estando envolvida também no desenvolvimento de resistência antifúngica a azóis e na virulência de *A. fumigatus*. (CHANG et al., 2007; CHUN; LIU; MADHANI, 2007; HUGHES; TODD; ESPENSHADE, 2005).

Ao encontrar situações de hipóxia, conseqüentemente há uma queda na disponibilidade de íons ferro, obrigando *A. fumigatus* aumentar a expressão da proteína SrbA de ligação ao elemento regulador de esterol, que também ativa o gene *HapX*, induzindo a produção de sideróforos. Ambos esses processos são responsáveis por regular grandes mudanças transcricionais e metabólicas nos mecanismos celulares de resposta à hipóxia e escassez de ferro, permitindo a sobrevivência do fungo no epitélio pulmonar onde esses componentes podem tornar-se escassos, como discutido. A deleção do gene *SrbA* resultou uma cepa de *A. fumigatus* incapaz de sobreviver a ambientes em condições de hipóxia, menos virulentas quando testadas em dois modelos diferentes de infecção em camundongos, e mais susceptíveis à ação de azóis, indicando que a proteína SrbA possui um importante papel em todas essas diversas respostas à estresses comumente encontrados durante a colonização de hospedeiros (WILLGER et al., 2008). Essas descobertas apontam para as vias de homeostase de ferro e biossíntese de ergosterol como importantes caminhos metabólicos atuantes em uma melhor resistência a condições de hipóxia e escassez de ferro, provavelmente gerando maior capacidade de virulência e desenvolvimento de mecanismos de resistência a antifúngicos em *A. fumigatus* (PEREZ-CUESTA et al., 2021; WILLGER et al., 2008).

1.4.5. Termotolerância

Um dos principais traços relacionados à virulência de *A. fumigatus* é a sua termotolerância, visto que é uma espécie que apresenta melhor crescimento em temperaturas de 40°C a 55°C (temperaturas comuns em casos de febre e em composteiras, respectivamente), do que em temperaturas próximas da temperatura média ambiente, como 25°C até 30°C. Entretanto, até os dias atuais, não foi identificada nenhuma via específica, responsável por

controlar exclusivamente a termofilia de *A. fumigatus* (DO; YAMAGUCHI; MIYANO, 2009; GAO et al., 2016; LAMARRE et al., 2008). Apesar disso, diversas vias metabólicas já foram indiretamente associadas com termotolerância como, por exemplo, a via de biossíntese da trealose.

Trealose é um dissacarídeo formado pela união de duas α -glicose, e está presente tanto em conídios, como nas hifas, sendo responsável por atuar na resistência a altas temperaturas de diversas formas (THAMMAHONG; PUTTIKAMONKUL; PERFECT, 2017). Isso ocorre porque esse composto pode ser rapidamente degradado e utilizado como fonte de energia para o metabolismo central após a germinação dos conídios (LATGÉ; CHAMILOS, 2019). Para além dessa função, a trealose também possui um papel crítico na estrutura celular, atuando como um protetor da integridade celular, especialmente em resposta à desidratação e estresse térmico. Como exemplo, foi proposto que a trealose forma ligações de hidrogênio com proteínas, interagindo com a cabeça polar dos grupos fosfolipídicos da membrana celular, mantendo a estrutura da membrana íntegra em casos de estresse térmico e hídrico. (O'MEARA; COWEN, 2014; THAMMAHONG; PUTTIKAMONKUL; PERFECT, 2017).

Entretanto, estudos a respeito do impacto da temperatura em fungos até pouco tempo focavam em estudar adaptações ao choque térmico, ao invés de voltar os olhos para adaptações relacionadas à exposição constante a altas temperaturas. Por esse motivo, aproximadamente 50 proteínas relacionadas ao choque térmico (HSPs) foram reportadas no genoma de *A. fumigatus*, mas essas HSPs são chaperonas de classes geralmente associadas à resistência ao estresse térmico agudo e momentâneo, de maneira geral, e não exclusivamente relacionadas às adaptações ao calor constante (ROBBINS et al., 2011; SCHNEIDER et al., 2016; SUEIRO-OLIVARES et al., 2015). HSPs de pequeno peso molecular, como Awh11, Hsp30, Hsp20 e Hsp12 parecem ser específicas, tanto para *A. fumigatus*, como em respostas a altas temperaturas, sem estarem envolvidas com crescimento *in vivo*, como visto para o mutante $\Delta awh11$. Porém, de maneira geral, apesar de possuir um papel extremamente importante na virulência de *A. fumigatus*, a resposta multigênica envolvida na resistência às altas temperaturas ainda necessita de mais investigação.

1.5. A importância da termotolerância para a virulência

Recentemente, novos estudos se aprofundaram no estudo de vias relacionadas à termotolerância, visto que há um número crescente, e negligenciado, de novas cepas fúngicas termotolerantes, provavelmente em consequência do fenômeno do aquecimento global (FABRI et al., 2021). Apenas quatro genes foram descritos e relacionados à sobrevivência de *A. fumigatus* em ambientes com temperaturas altas. O gene *thtA* é essencial para o crescimento de *A. fumigatus* a 48°C, porém não contribui diretamente com a virulência da espécie (CHANG et al., 2004). De maneira similar o gene *Afpmt1* é responsável por codificar uma O-manosil transferase, necessária para o crescimento acima dos 37°C, porém também não envolvida diretamente com a virulência (ZHOU et al., 2007). Uma putativa α -1,2-manosil transferase codificada por *Afmnt1* também foi reportada como necessária para o crescimento a 48°C (WAGENER et al., 2008). Esses autores mostraram que a cepa mutante Δ *Afmnt1* cresce normalmente a 37°C, e que os defeitos em relação ao crescimento que foram observados em crescimento a 48°C, eram decorrentes da instabilidade da parede celular, levando ao vazamento de conteúdo nas pontas das hifas. O mutante Δ *Afmnt1* apresentou virulência atenuada em modelos de infecção em camundongos, e mostrou também uma maior sensibilidade a tratamentos com azóis (WAGENER et al., 2008). De maneira semelhante, a deleção do gene *cgrA*, envolvido na biogênese de ribossomos, produziu uma cepa menos virulenta em modelo murino de aspergilose invasiva, mas não em modelos com mosca da fruta, sendo relacionado ao crescimento a 37°C (BHABHRA; ASKEW, 2005).

Células expostas a temperaturas altas, mas não letais, tornam-se transientemente resistentes a choques térmicos subsequentes, produzindo as proteínas chamadas de HSPs. O desenvolvimento da termotolerância é paralelo à expressão de genes relacionados às HSPs (NOLLEN et al., 1999). HSPs foram identificadas como chaperonas moleculares conservadas entre os diferentes tipos de organismos (BURNIE et al., 2006). Também já foi reportado que uma proteína Hsp1/Aspf12 (KUMAR et al., 1993) classificada como membro da família das Hsp90 poderia estar relacionada com a termotolerância. Somado a isso, a proteína formada por Hsp1/Aspf12 pode ter também um papel relacionado à imunidade protetiva e autoimunidade dos seres humanos,

visto que é um dos antígenos imuno dominantes em casos de aspergilose alérgica (KUMAR et al., 1993). Nierman *et al.* (2005) estudou as diferenças de expressão gênica entre 30°C e 37°C, e entre 30°C e 48°C, detectando alguns genes mais expressos a 37°C, porém até hoje, nenhum dos genes já relacionados a aspectos de virulência foi encontrado como sendo mais expresso a 48°C do que a 37°C. Após essas descobertas, foi concluído que a temperatura encontrada no hospedeiro (37°C) por si só, não é o suficiente para ativar a transcrição dos muitos genes já relacionados com a virulência de *A. fumigatus*.

Por outro lado, foi proposto por Do *et al.* (2009) que a tolerância térmica dessa espécie possa ser devido à eficiente regulação de genes metabólicos por parte de proteínas HSPs. Esses autores, através de uma análise de espaço de estados, examinaram a regulação transcricional, e descobriram uma associação negativa entre muitas HSPs e os genes metabólicos que elas regulam. Pouco se sabe a respeito das mudanças que ocorrem no proteoma de *A. fumigatus* ao encontrar temperaturas diferentes, mas um estudo recente descreveu 64 proteínas mais ou menos expressas quando comparando entre 30°C e 48°C. 4 delas, Hsp30/Hsp42 e Hsp90 mostraram maior aumento de expressão durante a resposta ao choque térmico em *A. fumigatus*. Mais estudos de mudanças no proteoma e suas relações com mudanças no transcriptoma poderiam melhorar o entendimento da termotolerância nessa espécie, e ajudariam a identificar possíveis novos alvos para o tratamento da AI. Recentemente também foi descoberto que, além de regular a biossíntese de parede celular e a sua manutenção, a via de integridade da parede celular (CWI) também possui sua atividade modulada durante a regulação da termotolerância em *A. fumigatus*, tendo sido demonstrado que Hsp90 interage com os principais membros da cascata de sinalização das vias de integridade da parede celular, realizando uma interligação dessas vias (ROCHA et al., 2021).

Hsp90 é fundamental para respostas a choque térmico em eucariotos, pois promove dobramento e montagem correta de novas proteínas sintetizadas (TAIPALE; JAROSZ; LINDQUIST, 2010). O fator de transcrição Hsf1 controla a expressão de Hsp90 em outros organismos, como *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *C. neoformans* e *C. albicans*, o que permitiu que Fabri *et al.* (2021) pudessem

identificar o gene homólogo a Hsf1 em *A. fumigatus*. Esse gene possui função nas regulações resultantes na termotolerância e também nas respostas associadas a estresses na parede celular, causando um aumento na espessura da parede, e que foi hipotetizado como um mecanismo chave para a resposta ao calor. Também foi revelado que o gene descoberto e nomeado *HsfA*, é um fator de transcrição essencial, necessário para a termotolerância e crescimento vegetativo, como também observado em outros organismos fúngicos supracitados (NICHOLLS et al., 2009; THOMPSON et al., 2008; WIEDERRECHT; SETO; PARKER, 1988; YANG et al., 2017).

Descobertas feitas por Fabri *et al.* (2021) indicam que, ao enfrentar condições de alta temperatura, ocorre um espessamento da parede celular de *A. fumigatus* devido ao choque térmico, e que HsfA participa desse processo através mecanismos interligados com as principais vias de sinalização que controlam a integridade celular do organismo, como as vias de integridade da parede celular, e as vias reguladas por genes da via HOG (high-osmolarity glycerol). De maneira resumida, foi demonstrado que HsfA contribui com a manutenção da integridade da parede celular, tendo sido observado também interações entre as proteínas HsfA e proteínas HSFs, em especial a proteína Hsp90. O estudo também evidenciou que MpkA e PkcA, que são proteínas centrais nas vias tradicionalmente reconhecidas como importantes para integridade celular, não são essenciais para a ativação de HsfA durante eventos de estresse térmico e danos na parede celular. Adicionalmente, foram identificados genes modulados por HsfA, incluindo genes relacionados com resposta ao choque térmico, biogênese da parede celular, metabolismo de lipídeos e homeostase de ferro, reforçando o conceito de que adaptações na parede celular contribuem com a termotolerância de *A. fumigatus* através de um mecanismo integrado que abrange respostas ao estresse térmico e a regulação das vias de sinalização relacionadas com a integridade da parede celular dos fungos, processos que também estão intimamente relacionados com as vias de geração de matriz extracelular e biofilme. (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021).

Portanto, pode-se dizer que apesar de alguns estudos terem obtido sucesso em identificar aspectos relacionados com a maior termotolerância e patogenicidade de *A. fumigatus*, ainda há muito para ser descoberto com

relação às interações existentes entre genes, proteínas e vias metabólicas envolvidas nos processos biológicos relacionados com a termotolerância e a capacidade de virulência (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021). Recentemente alguns estudos voltaram-se para análises comparativas, buscando traçar paralelos entre o funcionamento das variadas vias metabólicas, bem como as diferenças e semelhanças entre os mecanismos responsáveis pela virulência em espécies de diferentes gêneros, como *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum* (SISCAR-LEWIN; HUBE; BRUNKE, 2022). Outros estudos voltaram-se unicamente para o gênero *Aspergillus*, em especial para a seção *Fumigati*, buscando comparar o principal patógeno causador da aspergilose, *A. fumigatus*, com as outras diferentes espécies de *Aspergillus* presentes na seção, porém tidas como menos relevantes clinicamente, devido a sua capacidade reduzida, ou incapacidade de gerar doença (BROWN et al., 2022; DOS SANTOS et al., 2021; LI et al., 2020; ROKAS et al., 2020). É possível detectar uma série de diferenças fundamentais através de análises comparativas entre as diferentes espécies da seção *Fumigati*, como screenings de resistência a drogas antifúngicas, crescimento em diferentes fontes de nutrientes, análises metabolômicas e proteômicas, análises a nível genômico e transcriptômico, entre muitos outros.

Estudos comparativos são importantes por tornarem possível a identificação de caracteres comuns entre as diferentes espécies, bem como aqueles que estão presentes unicamente em *A. fumigatus*. É grande a importância e o potencial de análises comparativas, visto que ao entendermos a evolução da virulência entre os patógenos, podemos descobrir também quais as principais características, genes, proteínas e vias metabólicas envolvidas nas vias de virulência. Além disso, a descoberta de mecanismos de virulência exclusivos de *A. fumigatus*, o principal patógeno causador da aspergilose, podem ajudar a elucidar os principais genes, proteínas e vias metabólicas envolvidas na maior patogenicidade observada nessa espécie. Com base no que foi descrito, o estudo aqui relatado visa comparar e identificar as principais diferenças, entre *A. fumigatus* e outras três espécies, *A. lentulus*, *A. fischeri* e *A. oerlinghausenensis*, todas pertencentes à seção *Fumigati*, e consideradas como menos relevantes para casos clínicos. Para esse fim, foram feitas

análises de sequenciamento de RNA, buscando analisar o perfil transcriptômico dessas espécies quando germinadas a 30°C e 37°C, buscando identificar possíveis novos genes, vias metabólicas e metabólitos induzidos pela resposta à mudança de temperatura. Além de possibilitar um melhor entendimento dos genes e vias metabólicas relacionadas com a termotolerância, o presente estudo pretende também identificar possíveis genes relacionados a essa via, e que também sejam responsáveis pela maior patogenicidade de *A. fumigatus*, em comparação com outras espécies do gênero *Aspergillus*, consideradas clinicamente menos relevantes (HUBKA et al., 2018; STEENWYK et al., 2019, 2020).

Também buscando um melhor entendimento a respeito das principais vias exclusivas de *A. fumigatus* envolvidas com a sua maior termotolerância e virulência, foram realizadas, análises fenotípicas diversas, comparando as quatro espécies com relação às suas diferentes taxas de virulência em testes *in vivo*. Também, foram feitas análises das taxas de crescimento das quatro espécies em temperaturas variadas, diferentes formas de cultivo, como cultivo em meio sólido e meio líquido com agitação, em ambos os casos utilizando diferentes fontes de Carbono e Nitrogênio. Também foram testadas condições de escassez de nutrientes essenciais (oxigênio e ferro) e crescimento sob o efeito de drogas antifúngicas, assim como análises relacionadas à formação de biofilme e análises de perfil metabólico, buscando por possíveis diferenças e semelhanças entre os metabolismos primário e secundário das quatro espécies. Por fim, o presente estudo encontrou diferenças significativas entre *A. fumigatus* e as outras três espécies filogeneticamente próximas em diversos aspectos, trazendo importantes insights sobre possíveis vias metabólicas, e novos genes e proteínas importantes para os ainda não tão bem explicados mecanismos envolvidos na termotolerância, e maior patogenicidade de *A. fumigatus* em relação a outras espécies filogeneticamente próximas. Esses resultados podem fornecer importantes insights para estudos futuros que busquem preencher as lacunas de conhecimento que existem por trás das principais vias metabólicas envolvidas na maior patogenicidade e termotolerância de *A. fumigatus*, impactando positivamente futuros estudos que busquem também o desenvolvimento de medicamentos úteis nos mais diversos casos relatados de aspergilose, especialmente a aspergilose invasiva.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS GERAIS

A partir da hipótese de que o conjunto de genes, proteínas e o conjunto de vias metabólicas presentes exclusivamente em *A. fumigatus* possam explicar o maior sucesso dessa espécie como patógeno humano, o presente estudo caracterizou fenotipicamente quatro diferentes espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes à seção *Fumigati*: *A. fumigatus* (cepa CEA17), *A. oerlinghausenensis* (cepa CBS139.183), *A. fischeri* (cepa NRRL181) e *A. lentulus* (cepa CNM-CM6069). As quatro espécies foram testadas em diversos métodos de cultivo e fontes variadas de nutrientes. Também foram avaliadas características do biofilme produzido durante o desenvolvimento das quatro espécies em condições semelhantes às encontradas durante o contato com um organismo hospedeiro, bem como ensaios *in vivo* para analisar os níveis de virulência de cada espécie. Após a caracterização fenotípica, foram avaliados os níveis de modulação gênica, através de um sequenciamento e RNA, de durante o desenvolvimento em condições de temperatura semelhantes às do organismo hospedeiro, comparando *A. fumigatus* com *A. oerlinghausenensis* e *A. fischeri*, que são duas outras espécies consideradas menos relevantes clinicamente. Os dados do sequenciamento de RNA foram analisados e validados posteriormente via outros ensaios fenotípicos, em busca de possíveis características exclusivas de *A. fumigatus* capazes de explicar seus maiores índices de virulência. Descobertas a respeito das características exclusivas de *A. fumigatus*, espécie relatada em 90% dos casos de AI, podem ajudar na elucidação dos meios pelos quais *A. fumigatus* obtém maior sucesso na colonização de indivíduos humanos, bem como auxiliar a desvendar possíveis vias alvo de tratamentos médicos no futuro.

2.1. Objetivos específicos

- 1) Avaliação fenotípica de espécies de *Aspergillus* na seção *Fumigati* (*A. fumigatus*, *A. fischeri*, *A. oerlinghausenensis* e *A. lentulus*) através de ensaios de em diferentes condições de crescimento
- 2) Avaliar as diferenças na composição da parede celular, matriz extracelular e biofilme das quatro espécies de *Aspergillus* em questão.

3) Avaliar o perfil transcriptômico de de *A. fumigatus* comparativamente com *A. fischeri* e *A. oerlinghausenensis* durante a transição térmica de 30 para 37 C

4) Avaliação da patogenicidade de espécies de *Aspergillus* da seção *Fumigati* (*A. fumigatus*, *A. fischeri*, *A. oerlinghausenensis* e *A. lentulus*) através de ensaios *in vivo* utilizando-se diferentes modelos animais

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas neste trabalho

Para o presente estudo, foram utilizadas as linhagens *A. oerlinghausenensis* (cepa CBS139.183), *A. lentulus* (cepa CNM-CM6069), *A. fischeri* (cepa NRRL181) e *A. fumigatus* (cepa CEA17).

3.2. Meios de Cultura

3.2.1. Meio mínimo (MM, MM+UU)

Solução de sais 20X (Kafer, 1997) - **1X**

Solução de elementos traços - **0,1% (v/v)**

Glicose - **1% (p/v)**

Agar - **2% (p/v)**

MM+UU indica o meio mínimo de cultura (MM) suplementado com uridina 5 mM e uracila 5 mM. Para a regeneração de protoplastos, utilizou-se meio completo + KCl (0,6M). Os meios MM e MM+UU líquidos são iguais em composição, respectivamente, aos meios sólidos, entretanto sem a adição de ágar 2% (p/v). Para meio Top Agar de regeneração dos protoplastos foi adicionado 1% (p/v) de ágar. O volume final foi ajustado com água destilada. O pH foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio (2M). Esterilizou-se em autoclave.

3.2.2. Meio mínimo adaptado (MMA)

Foram utilizadas diversas versões de Meio Mínimo Adaptado.

3.2.2.1. Meio de cultura para ensaios de escassez de ferro

Para os ensaios de escassez de ferro foi utilizado meio mínimo, onde os elementos traços originais foram substituídos por uma solução de elementos

traços sem ferro. Após preparo do meio de cultura (sólido e/ou líquido), o material foi esterilizado em autoclave.

3.2.2.2. Meio de cultura para ensaios de escassez de glicose

Para os ensaios com fontes alternativas de carbono, foi utilizado meio mínimo líquido sem adição de glicose. Com relação às fontes alternativas de carbono, foram preparadas soluções estoque de Tween 20 [25%(p/v)], Tween 80 [25%(p/v)], e óleo de oliva [100%(p/v)]. Após preparo do meio de cultura e das soluções, o material foi esterilizado em autoclave. O meio mínimo adaptado sem glicose foi então adicionado das respectivas soluções até que estivessem todos os frascos com um volume final de 50mL e a concentração final de 1% (p/v), sendo que apenas uma fonte alternativa de carbono foi adicionada por frasco. Foram feitos testes em triplicata para cada espécie em cada meio.

3.2.3. Potato Dextrose Ágar modificado (PDA)

Solução de sais 20X (Kafer, 1997) - **1X**

Elementos traços - **0,1% (v/v)**

Agar - **2% (p/v)**

Difco Potato Dextrose Broth - **24g/L**

O meio PDA líquido é igual em composição, respectivamente, ao meio sólido, entretanto sem a adição de ágar 2% (p/v). O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.2.4. Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU)

Extrato de levedura - **0,5% (p/v)**

Glicose - **2% (p/v)**

Ágar - **2% (p/v)**

Solução de elementos Traços - **0,1% (v/v)**

O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave. YUU indica o meio de cultura completo YAG suplementado com uridina 4 mM e uracila 10 mM. Para a regeneração dos protoplastos, utilizou-se meio completo + KCl (0,6M). Os meios YG e YG+UU são iguais em composição, respectivamente, aos meios YAG e YUU, entretanto sem a adição de ágar 2% (p/v). Para meio Top Agar de regeneração dos protoplastos foi adicionado 1%

(p/v) de ágar. Em experimentos onde se necessitava de repressão do promotor *alcA*, foi utilizado meio contendo glicose 4%.

3.2.5. Meio YPD

Extrato de levedura - **0,5% (p/v)**

Peptona de caseína - **0,5% (p/v)**

Glicose – **1,5% (p/v)**

Os componentes foram dissolvidos em água destilada, o pH foi ajustado para 6,3 e o meio foi esterilizado em autoclave. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

3.2.6. Meio Luria Bertani (LB)

Extrato de Levedura - **0,5% (p/v)**

Cloreto de Sódio - **0,17M**

Triptona - **1% (p/v)**

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o meio foi esterilizado em autoclave. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

3.2.7. Meio Beef extract

Ágar - **2% (p/v)**

Gibco Beef Extract Powder - **1% (p/v)**

O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.2.8. Meio Ágar + Soro Fetal Bovino

Ágar - **2% (p/v)**

Gibco Fetal Bovine Serum (FBS) - **10% (v/v)**

O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.2.9. Meio RPMI-1640

Roswell Park Memorial Institute 1640 medium em pó - **1 sachê/L**

Tampão HEPES - **2,4g/L**

Tampão MOPS - **0,165M**

Esterelizado via filtração à vácuo em sistema de filtração Kasvi. Quando utilizado com tampão MOPS, o pH foi ajustado para 7 com hidróxido de sódio (2M).

3.3. Soluções e Tampões

3.3.1. Solução de elementos traços

Sulfato de zinco heptahidratado - **75 mM**

Ácido bórico - **180 mM**

Cloreto de manganês tetra hidratado - **25 mM**

Sulfato de ferro heptahidratado - **18 mM**

Cloreto de cobalto pentahidratado - **6 mM**

Sulfato de cobre pentahidratado - **6 mM**

Molibdato de amônio tetra hidratado - **1 mM**

EDTA - **140 mM**

Os componentes foram adicionados na ordem listada em 1/8 do volume final de água destilada. Cada componente foi dissolvido completamente antes de adição do próximo. A solução foi aquecida até 100°C e então resfriada para 60°C. Ajustou-se o pH entre 6,5 e 6,8 com solução de hidróxido de sódio (10 M). Deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente para acerto do volume final.

3.3.2. Solução de sais 20X concentrada para MM (KÄFER, 1977)

Nitrato de Sódio - **3,2M**

Cloreto de Potássio - **0,14M**

Dihidrogenofosfato de Potássio - **0,2M**

Sulfato de Magnésio heptahidratado - **0,04M**

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo.

3.3.3. Soluções de protoplastização para transformação em *Aspergillus*

3.3.3.1. Solução 1 de protoplastização

Sulfato de amônio - **0,8M**

Ácido cítrico pH 6 - **100mM**

Dissolveu-se o sulfato de amônio em água destilada e adicionou-se o volume adequado de solução de ácido cítrico 1M, pH 6 previamente preparada. Ajustou-seo volume e esterilizou-se em autoclave.

3.3.3.2. Solução 2 de protoplastização

Extrato de levedura - **1% (p/v)**

Sacarose - **2% (p/v)**

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.3.3. Solução 3 de protoplastização

Sulfato de amônio - **0,4M**

Sacarose - **1% (p/v)**

Ácido cítrico pH 6 - **50mM**

Sulfato de amônio e sacarose foram dissolvidos em água destilada. Adicionou-se o volume necessário de uma solução de ácido cítrico 1M, pH 6 previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.3.4. Solução 4 de protoplastização

Polietilenoglicol PM 6000g/mol - **25% (p/v)**

Cloreto de cálcio dihidratado - **100mM**

Cloreto de potássio - **0,6M**

Tris HCl pH 7,5 - **10mM**

Dissolveram-se os componentes em água destilada e acrescentou-se o volume

necessário de solução Tris HCl, pH 7,5 (1M) previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.3.5. Solução 5 de protoplastização

Cloreto de cálcio dihidratado - **50mM**

Cloreto de potássio - **0,6M**

MES pH 6,0 - **10mM**

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.4. Solução depurinizante

Ácido clorídrico - **0,25M**

O volume necessário de ácido foi diluído em água destilada e o volume final acertado.

3.3.5. Solução salina citrato (SSC) 20X concentrada

Cloreto de sódio - **3M**

Citrato de sódio dihidratado - **300mM**

Dissolveu-se em água destilada, ajustou-se em pH 7,0 com hidróxido de sódio (4M) e completou-se o volume com água destilada.

3.3.6. Solução SDS 10%

SDS - **10g**

Água destilada q.s.p. - **100 ml**

Dissolveu-se em água destilada e acertou-se o volume.

3.3.7. Soluções estoque de drogas utilizadas

Dissolveu-se metil metanossulfonato (MMS) agente alquilante do DNA 5% em água. Dissolveu-se menadiona (MENA) indutor de estresse oxidativo 0,5M em DMSO. Dissolveu-se óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) mimetizante de radiação UV 100 µg/ml em DMSO. Dissolveu-se caspofungina (CSP) a 1mg/mL em água. Dissolveu-se bromidrato de piritiamina a 5mg/mL em água.

3.3.8. Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10X concentrado

Cloreto de sódio - **350mM**

Cloreto de potássio - **180mM**

Hidrogenofosfato de sódio - **25mM**

Dihidrogenofosfato de potássio - **18mM**

Dissolveu-se em água destilada até o volume final. Esterelizado via filtração à vácuo em sistema de filtração Kasvi ou autoclave.

3.3.9. Tampão de amostra para eletroforese de DNA

Azul de Bromofenol - **0,1mg/ml**

Xileno cianol - **0,1mg/ml**

Glicerol - **50%(v/v)**

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

3.3.10. Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50X concentrado

Tris Base - **242g**

Ácido Acético Glacial - **57,1ml**

EDTA 0,5M pH 8,0 - **100ml**

Água destilada q.s.p. - **1L**

Acertou-se para pH 8 e esterilizou-se em autoclave. Para uso na eletroforese de DNA, o tampão foi diluído 1X.

3.3.11. Tampão de extração de DNA

Tris-HCl pH 8,5 - **200mM**

Cloreto de sódio - **250mM**

EDTA - **25mM**

SDS - **0,5%(p/v)**

Dissolveu-se em água destilada.

3.3.12. Tampões para hibridização de sondas de Southern Blotting

3.3.12.1. Tampão de Hibridização

Adicionar NaCl (apropriado para pesquisa) ao tampão de hibridização fornecido pelo kit “*Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System*” da GE Healthcare, para deixá-lo com uma concentração de 0,5M.

Adicionar reagente de bloqueio fornecido pelo kit, de maneira lenta, gradual e sob agitação magnética constante para obter melhor resultado, até atingir uma concentração final de 4% (p/v). Deixar misturando por 1 a 2 horas a temperatura ambiente, podendo ser utilizado imediatamente após o término do processo.

3.3.12.2. Tampão de Lavagem 1

Água - 1 litro

Uréia - 120g - 2M

SDS - 1g - 0,1% (p/v)

100mL de fosfato de sódio 0,5M e pH 7- 50mM

NaCl - 8,7g – 150mM

1mL de MgCl₂ 1M- 1mM

Reagente blocking - 2g - 0,2% (p/v)

3.3.12.3. Tampão de Lavagem 2

Água - 1 litro

TRIS base - 121g - 1M

NaCl - 112g - 2M

Diluir a solução em 1:20 e adicionar 2mL/L de MgCl₂ a 1M para chegar à concentração final de 2mM de magnésio no tampão

3.4. Protocolos adotados

3.4.1. Métodos de coleta de esporos e cultivo

3.4.1.1. Suspensão, contagem e diluição de esporos

Todos os experimentos aqui descritos foram realizados em câmara de fluxo laminar estéril para evitar contaminações no processo. Para obtenção dos esporos das espécies de *Aspergillus* utilizadas nesse trabalho, foram feitos cultivos em placas de petri em Potato Dextrose Ágar ou Meio Mínimo, a depender do ensaio a ser realizado. As condições de temperatura para o cultivo também foram variáveis, hora 30°C, hora 37°C, a depender do ensaio a ser realizado. Após passado o tempo de incubação nas estufas, os esporos foram coletados das placas por meio de raspagem com swab estéril descartável e água ultrapura autoclavada, ou tampão PBS 1x para

experimentos *in vivo*. A suspensão de esporos em meio líquido foi então coletada com auxílio de pipetas pasteur estéreis e descartáveis de 3mL, em tubos falcon estéreis de 50 mL. As suspensões de esporos foram filtradas através de filtros miracloth estéreis, e em casos de experimentos *in vivo*, também eram lavadas através de 3 rodadas de centrifugação a 13000rpm e ressuspensão em solução PBS 1x estéril. As suspensões prontas foram então diluídas e contadas em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio. As suspensões eram então diluídas nas concentrações e volume desejados para cada experimento a ser realizado.

3.4.2. Ensaios de fenotipagem

3.4.2.1. Crescimento radial em meio sólido

Crescimento radial foi determinado a partir da incubação de placas com gotas de 5 μ L de suspensão contendo 10⁵ esporos de cada cepa, aplicadas no centro de uma placa de petri com meio sólido, e incubadas por um total de 5 dias, até a medição do diâmetro das colônias formadas. Todos os experimentos foram feitos com pelo menos triplicatas biológicas, tendo sido cultivadas a 30°C, 37°C e 44°C e nos diversos meios de cultura descritos nesse trabalho, a depender da situação.

Em experimentos que visavam avaliar o crescimento de todas as espécies sob condições de hipóxia (1% O₂, 5% CO₂) ou normóxia (aproximadamente 20% O₂ e 0.04% CO₂) placas de petri com meio sólido, foram incubadas a 37°C em estufa capaz de manter condições de hipóxia através da injeção de gases, ou estufa comum para condições de normóxia, por um período de 5 dias, alterando apenas o meio de cultivo utilizado, a depender do experimento.

Experimentos com escassez de ferro foram feitos com meio mínimo suplementado com concentrações de 200 μ M de agentes quelantes de ferro ácido batofenantrolinadissulfônico (BPS) e 300 μ M de ferrozina (3-[2-pyridyl]-5,6-bis[4-phenylsulfonic acid]-1,2,4-triazine). Compostos indutores de estresse na parede celular utilizados foram: menadiona [0,015mM; 0,03mM; 0,06mM; 0,12mM], 4-Nitroquinolina 1-óxido (4-NQO) [0,01 μ g/mL; 0,1 μ g/mL; 1 μ g/mL], Miracle Mineral Supplement (MMS)[0,0001%; 0,005%; 0,02%; 0,05%], Congo Red (CR) e Calcofluor white (CFW) [30 μ g e 50 μ g] e (CSP) [0,125 μ g/mL;

0,25µg/mL; 0,5µg/mL; 1µg/mL; 8µg/mL]. Todos os compostos foram adicionados a partir de uma solução estoque de concentração conhecida, de acordo com o volume necessário para atingir suas diferentes concentrações desejadas, com o meio sólido ainda fundido, porém em temperatura morna para ambiente.

3.4.2.2. Crescimento em meio líquido e análises de peso seco

Em experimentos de peso seco, foram incubados 10^6 esporos por um período de 3 dias de crescimento, em 30ml de meio líquido a 160 rpm. Foram feitos inóculos em triplicatas para cada espécie em cada meio de cultura testado. Os micélios foram então coletados através de um sistema composto por uma bomba de sucção a vácuo e membrana de papel filtro. Após esse processo, os micélios foram então embrulhados em papel alumínio, identificados e congelados em nitrogênio líquido. Após congelados, passaram por um processo de 48h de liofilização a vácuo, sendo pesados e documentados logo em seguida.

3.4.3. Quantificação da média esporos produzidos por cada espécie

Após passados os cinco dias de incubação de experimentos de crescimento radial das quatro espécies de *Aspergillus* cultivadas em meio PDA sólido modificado, as mesmas placas foram utilizadas para a coleta de três amostras de mesmo tamanho, de pontos com fungo cultivado em cada uma das placas, de cada espécie, em cada temperatura. Após homogeneização via vórtex em solução de tween 20 a 0,05%, os esporos foram diluídos e contados em câmara de Neubauer e com auxílio de microscópio.

3.4.4. Incubação de esporos, extração de RNA

Para a obtenção do RNA utilizado tanto para a análise transcriptômica como para a síntese do cDNA foram cultivados esporos das três espécies analisadas (*A. fumigatus*, *A. oerlinghausenensis* e *A. fischeri*) a 30°C para simular temperatura ambiente, os quais foram coletados pelo método descrito previamente. Após contagem e diluição dos esporos cultivados a 30°C, foram feitos três inóculos em 30mL de meio PDA líquido (PD) contendo 4×10^7 esporos para cada espécie em cada tratamento de temperatura (30°C e 37°C), por um período de 24h. Após o período de inóculo, os micélios cultivados foram

filtrados em miracloth estéril e rapidamente envoltos por papel alumínio, identificados e congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, o RNA do micélio cultivado foi extraído via maceração com um pistilo e um cadinho diferentes para cada espécie e cada tratamento. Após macerados, os micélios foram rapidamente dissolvidos utilizando 1mL do reagente TriZol (Invitrogen) para cada amostra, sendo imediatamente vortexados vigorosamente para promover a quebra das células presentes nas amostras. Foram então adicionados 300µL de clorofórmio puro em cada amostra, as quais foram vortexadas novamente e colocadas em repouso durante cinco minutos a temperatura ambiente para que as moléculas de RNA fossem dissolvidas adequadamente, e então centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm a 4°C para separação das partes indesejadas. O sobrenadante de cada amostra, contendo o material genético e transcriptômico foi coletado e misturado por inversão com 500µL de isopropanol. Feito isso, as amostras foram então novamente centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. Nesse ponto as moléculas de interesse foram precipitadas devido à presença do isopropanol, o sobrenadante da amostra foi descartado, sendo preservado o pellet, que foi então ressuscitado em 1mL de etanol 75% gelado. As amostras foram novamente centrifugadas a 4°C e 12000 rpm para realizar a lavagem do material. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi seco a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Passado esse tempo, as amostras foram ressuscitadas em 30µL de água DEPC RNase free da marca Ambion. Após esse processo de extração as amostras tiveram suas concentrações checadas via nanodrop. Após terminada a extração de RNA, as amostras foram tratadas com DNase 0,5U/µg de RNA tratado, para que fossem mantidas apenas moléculas de RNA nas amostras. Após adicionados o tampão e a DNase, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Após o tratamento com DNase, as amostras de RNA foram então purificadas com a utilização do kit RNAeasy Mini kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA de cada espécie em cada tratamento foi então quantificado utilizando o Fluorometro Qubit, e a qualidade do RNA foi avaliada utilizando o Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) com um número de integridade mínima de RNA (RIN) de valor 7.0

3.4.5. Sequenciamento de RNA

Foi utilizado um Illumina NovaSeq 6000 System mRNA Sample Preparation kit. Moléculas de RNAm contendo cauda poli A foram selecionados utilizando beads magnéticas contendo cauda poli T. Fragmentação e preparação de bibliotecas com finais pareados foi feita utilizando cations divalentes e fragmentação termal. Síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando-se transcriptase reversa (Superscript II) e primers aleatórios. Em seguida, uma segunda fita de cDNA foi sintetizada utilizando DNA polimerase I e RnaseH e dUTP. Bibliotecas foram preparadas utilizando o TruSeq Stranded mRNA LT Set B kit (Illumina) e sequenciados (2 X 100 pb) em um instrumento LNBR NGS sequencing facility HiSeq 2500. Os dados do sequenciamento de RNA (RNAseq) foram processados para checagem de qualidade versão 0.11.5 da ferramenta FastQC, limpeza e remoção de RNAr com o software Trimmomatic, e mapeamento genômico foi feito com o software HISAT2 e as anotações dos genomas sequenciados em Steenwyk et al. (2020). Os dados foram em seguida filtrados e organizados com o software SAMtools. Após esse processo, foi feita a contagem das leituras de cada gene detectado com o software digital HTseq-Count, e finalmente foi feita a análise de expressão diferencial com o software DESeq2 (versão 1.24.0). O método padrão de Benjamini e Hochberg foi utilizado para correção múltipla de hipóteses de genes diferencialmente expressos em DESeq2. As análises aqui descritas foram adaptadas a partir dos métodos descritos em Wu et al. (2021)

3.4.6. Extração de DNA genômico

Para a produção de biomassa de micélio, 10^7 esporos das quatro espécies foram inoculados em meio de cultura líquido (MM, PDB ou meio completo, a depender da situação) e incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C e 200 rpm. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com pistilo e cadinho. Para cada cerca de 40 mg de micélio foram acrescentados 500 µl de Tampão de Extração de DNA. Foi adicionado em cada amostra, um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e vortexado por 1 minuto por três vezes. Para sedimentar as proteínas precipitadas e debris celulares, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida

para um novo tubo de microcentrífuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol ou clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo, onde foi adicionado 540 µl de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 13000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O pellet foi ressuspensionado em água ultrapura estéril e estocado a 4°C e quantificado por nanodrop (espectofotômetro).

3.4.7. Produção de cDNA a partir das amostras utilizadas para o RNAseq

Foi utilizado 1mg de RNA, o qual foi reversamente transcrito para cDNA utilizando ImProm II™ Reverse Transcriptase Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.8. Análises via qPCR

Análises quantitativas de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas a partir das amostras de cDNA produzidas a partir do RNA utilizado nas análises de RNAseq. Para as análises, primeiro foram feitas curvas padrão de quantificação para cada par de primers, utilizando quantidades conhecidas de DNA alvo em diluições seriadas em diversas ordens de magnitude. O montante de DNA genômico alvo utilizado em misturas de reações paralelas foi calculado utilizando o tamanho do genoma das espécies avaliado em torno de 30-35 Mb. Foi obtida uma relação linear traçando o ciclo de limiar contra o logaritmo da quantidade conhecida de material inicial. A equação da linha que melhor se adequou aos dados obtidos foi obtida através de uma análise de regressão linear. Os valores obtidos de R^2 foram calculados para o conjunto de dados de cada espécie para estimar a precisão do método de quantificação via qPCR. O número de cópias do gene alvo contidas em uma amostra desconhecida foi determinado pela extrapolação da regressão linear da curva padrão obtida para cada primer. Em todos os experimentos foram utilizados controles negativos apropriados, contendo nenhum DNA alvo e passando pelo mesmo

procedimento, para excluir ou detectar quaisquer contaminações. Cada amostra foi repetida pelo menos três vezes. Todas as misturas de reação foram analisadas via gel de agarose para confirmar que apenas um produto de PCR foi sintetizado. Os resultados foram analisados utilizando os CTs obtidos para os genes alvo. Todas as reações de PCR foram realizadas com um sistema ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) e SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os genes e primers analisados estão listados na tabela 1.

Gene	Primer Foward	Primer Reverse
AFUB_053180	GCTGTTCGTTGATGATTGCGG	GGTTCCAAACACACAGCACC
AFUB_075600	CTCTGGTTCGGCTTCTTCGT	ACTCGACGACCCGGAAGATA
AFUB_077810	ATTCGGTCAGTGTTTCGGCT	GCTTTTCCTCCTGCTCGGTA
AFUB_077820	CGACTGGCCGAATACCTTCA	CATGTCTCTGGCCTGTGTGT
AFUB_081810	TATTCCTCGTCTCTGCGCTG	AAAGTGGAAGATCGCCTGCA

Tabela 1: Genes detectados na análise de RNAseq como significativamente mais expressos ($\log_2 \geq 1$) e seus respectivos primers utilizados nas análises de qPCR para confirmação do sequenciamento de RNA.

3.4.9. Ensaios *in vivo*

3.4.9.1. Declaração de ética

Os princípios que guiam esse estudo são baseados na declaração dos direitos dos animais ratificada pela UNESCO no dia 27 de janeiro de 1978 nos artigos 8° e 14°. Todos os protocolos utilizados nesse estudo foram aprovados pelos comitês de ética locais para experimentação em animais da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (número de licença 08.1.1277.53.6). Todos os animais foram tratados em estrita conformidade com os princípios delineados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) – Princípios Éticos na Experimentação Animal.

3.4.9.2. Modelo de *Galleria mellonella*

Para análise da patogenicidade de cada uma das cepas estudadas neste projeto, foram feitos testes em Larvas de *Galleria mellonella*, tanto a 30°C como a 37°C. Por possuírem um sistema imune inato bastante semelhante com o dos mamíferos, as larvas são utilizadas também como um

bom modelo para predição de virulência de cepas de *Aspergillus*, bem como outros fungos patogênicos. Como são animais incapazes de controlar a temperatura do corpo, experimentos feitos em 30°C e 37°C permitem avaliar se a temperatura também é um fator importante para a virulência observada pelas cepas sendo testadas. As larvas são cultivadas em estufas a 30°C, mantidas em jarros, nos quais são separadas por fase de vida: Ovos, larvas, pupas e mariposas. As larvas foram alimentadas uma vez por semana, com alimentação composta de extrato de levedura 1,5%, soja 1%, leite em pó 1%, mel 1% e cera de abelha 2%. Durante a sexta semana da fase larval, as larvas estão adultas e em maior tamanho, facilitando a infecção. As larvas foram separadas em grupos de 10 larvas em placas de petri descartáveis. Os grupos foram compostos de larvas com aproximadamente 300mg em peso, com 2cm e comprimento. O sexo das larvas não foi levado em conta, visto que com apenas 6 semanas de estágio larval é impossível detectar o sexo de cada espécime.

3.4.9.3. Modelo quimioterápico de infecção em camundongos

O modelo de aspergilose invasiva em camundongos quimioterápicos foi feito de acordo com Dinamarco et al. (2012b). Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com peso de 20 a 22g foram mantidos em grupos de 5 animais em caixas ventiladas. Os camundongos foram imunossuprimidos com uma concentração de 150mg por kg de peso corporal de ciclofosfamida administrada via intraperitoneal nos dias -4, -1 e 2 após a infecção (dia 0). Acetato de Hidrocortisona (200mg/kg) foi injetado via subcutânea no dia -3. Conídios assexuais de cada uma das cepas de *Aspergillus* utilizados durante a inoculação foram crescidos em meio PDA modificado por 5 dias antes da infecção. Conídios frescos foram coletados em PBS e filtrados em miracloth (Calbiochem). Suspensões de conídios foram centrifugadas por 5min a 3000xg, lavados 3x em PBS, contados com hemocítômetro, e então ressuspensos a uma concentração de $5,0 \times 10^6$ conídios/ml. A viabilidade das contagens administradas nos inóculos foi determinada seguindo uma diluição seriada e plaqueamento de *Aspergillus* em MM e incubação a 37°C. Os camundongos foram anestesiados via inalação de halotano e infectados via instilação intranasal de $1,0 \times 10^5$ conídios em 20µl de PBS. Como controle negativo, um

grupo de cinco camundongos recebeu apenas PBS. Os camundongos foram pesados a cada 24h, e inspecionados visualmente duas vezes por dia, todos os dias, desde o dia das infecções. Na grande maioria dos casos, ao ponto final do experimento de sobrevivência os camundongos perderam 20% de sua massa corporal, período no qual os sobreviventes foram sacrificados. A significância estatística das análises comparativas de sobrevivência foi calculada utilizando a ferramenta log rank analysis do software Prism statistical analysis.

3.4.10. Análises da aderência de biofilme com Cristal Violeta

Após a incubação de 2×10^3 esporos em meio RPMI + HEPES, por um período de 24h em placas descartáveis de 96 poços, a produção de biofilme foi quantificada através do método de coloração com cristal violeta (CV). O biofilme aderido à placa foi seco a 37°C por 30 min e então tingido com 200µl de CV - 0.05% (p/vol) por 10min. As placas foram então lavadas com 200µl de PBS por 10x, e o CV foi solubilizado com 200µl de etanol 95% e transferido para uma nova placa de 96 poços, sendo a absorbância de 570nm determinada para a análise das amostras em espectrofotômetro.

3.4.11. Análises via imagens geradas em microscópio

3.4.11.1. Medição de diâmetro de esporos

Os diâmetros de 100 esporos de cada espécie foram medidos por um microscópio de fluorescência Carl Zeiss (Jena, Germany) AxioObserver.Z1, equipado com uma lâmpada de mercúrio 100-W HBO. Foi utilizada a objetiva de 100x de magnificação de imagem com óleo de imersão. O AxioVision software v.3.1 foi utilizado para captação das imagens e a medição dos esporos.

3.4.11.2. Análises de biofilme das espécies de *Aspergillus*

Foram geradas uma série de imagens através de 300µm de biofilme em pratos de MatTek com uma objetiva multi-imersão de x20 (Nikon). Para geração de biofilme, as espécies de *Aspergillus* foram incubadas numa concentração de 1×10^5 esporos/ml em MM líquido por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Para a quantificação da arquitetura de biofilme, a matriz foi corada com

25µg de Calcofluor White e analisada sob 405nm. Imagens foram analisadas de acordo com a verticalidade e o biovolume utilizando o BiofilmQ em colaboração com os Drs. Robert A. Cramer Jr., Charles Puerner, Carey Nadel na faculdade de Dartmouthhere, EUA, utilizando a metodologia publicada em Kowalski et al. (2020).

3.4.12. Análise estatística

As análises estatísticas desse estudo variaram de acordo com o teste mais adequado para cada situação. As análises foram feitas no programa GraphPad prism 8, e foram utilizados testes de ANOVA de um e dois fatores, múltiplos testes t student, Análises de Mantel-Cox e teste exato de Fisher. Foram escolhidos os testes mais apropriados para cada experimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização fenotípica das cepas

4.1.1. *A. fumigatus* apresenta maior crescimento radial que outras espécies em temperaturas elevadas em diversos meios de cultura

Inicialmente, as quatro espécies aqui estudadas foram analisadas quanto a seus respectivos crescimentos radiais em meio de cultura mínimo sólido, contendo glicose como fonte de Carbono. A Figura 1 mostra o crescimento das quatro espécies de *Aspergillus* nas mencionadas condições.

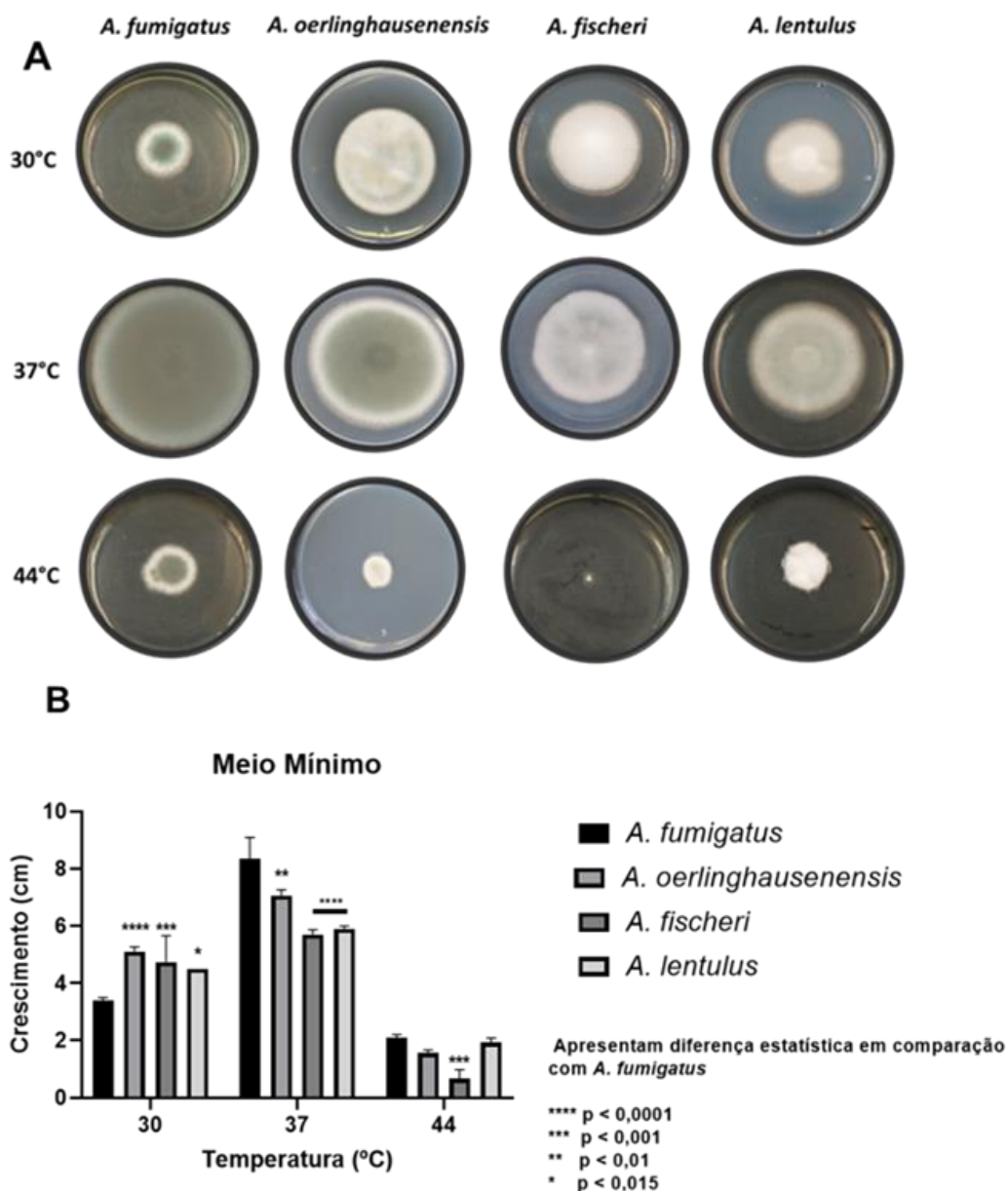


Figura 1: Perfil de crescimento radial das espécies de *Aspergillus* em Meio Mínimo **A.** Análise do crescimento radial das cepas de interesse em meio mínimo sólido. ANOVA para a comparação de dois fatores comparando o crescimento das espécies após cinco dias de cultivo em três temperaturas diferentes. **B.** Histogramas com os dados, apontadas diferenças em relação ao crescimento de *A. fumigatus*.

Conforme observado, quando as placas foram incubadas à 30°C, dentre as 4 espécies analisadas, *A. fumigatus* foi a espécie que apresentou o menor crescimento radial, 3,4cm ± 0,08, enquanto *A. oerlinghusenensis* e *A. fischeri* foram as espécies que apresentaram o maior crescimento radial nessa temperatura, 5,1cm ± 0,14 e 4,7cm ± 0,75, respectivamente. Quando incubadas à 37°C, as placas contendo *A. fumigatus* exibiram maior crescimento radial quando comparado a todas as espécies analisadas (8,3cm ± 0,6)

seguido das espécies *A. oerlinghausenensis*, *A. lentulus* e *A. fischeri* (7 cm ± 0,16; 5,9cm ± 0,08; 5,7cm ± 0,14, respectivamente). Esses dados indicam que em temperaturas próximas à temperatura intracorpórea do hospedeiro humano (37°C) *A. fumigatus* é mais eficaz em termos de crescimento, sugerindo que essa espécie pode ter sofrido alguma adaptação evolutiva ao longo do tempo, favorecendo o seu crescimento em temperaturas mais elevadas (LATGÉ; CHAMILOS, 2019; ROKAS et al., 2020). *A. fumigatus* é uma espécie reconhecidamente termotolerante, além de também ser termofílica, ou seja, o seu melhor crescimento em temperaturas mais elevadas que a temperatura ambiente é uma de suas características mais marcantes (ABAD et al., 2010), visto seu pior desempenho dessa espécie a 30°C quando comparado ao crescimento das outras espécies.

Curiosamente, apesar da termotolerância ser uma característica marcante em *A. fumigatus*, em 44°C apenas *A. fischeri* apresentou crescimento significativamente menor quando comparado com *A. fumigatus*, indicando que a tolerância térmica em temperaturas próximas à 44°C pode ser encontrada tanto em outras espécies não virulentas (*A. oerlinghausenensis*), como em outras espécies com virulência atenuada (*A. lentulus*), não sendo, portanto, uma característica exclusiva do principal agente causador da API, *A. fumigatus*.

Para verificar se o resultado obtido estava relacionado ao tipo de meio de cultura utilizado, o crescimento radial das mesmas espécies foi analisado utilizando-se um meio de cultura complexo, o meio PDA, adicionado de solução de sais e solução de elementos traços, o que acaba por tornar o meio considerado rico em nutrientes para crescimento pleno desses microrganismos. Os experimentos foram executados exatamente da mesma forma descrita anteriormente alterando-se apenas o meio de cultura utilizado (Figura 2).

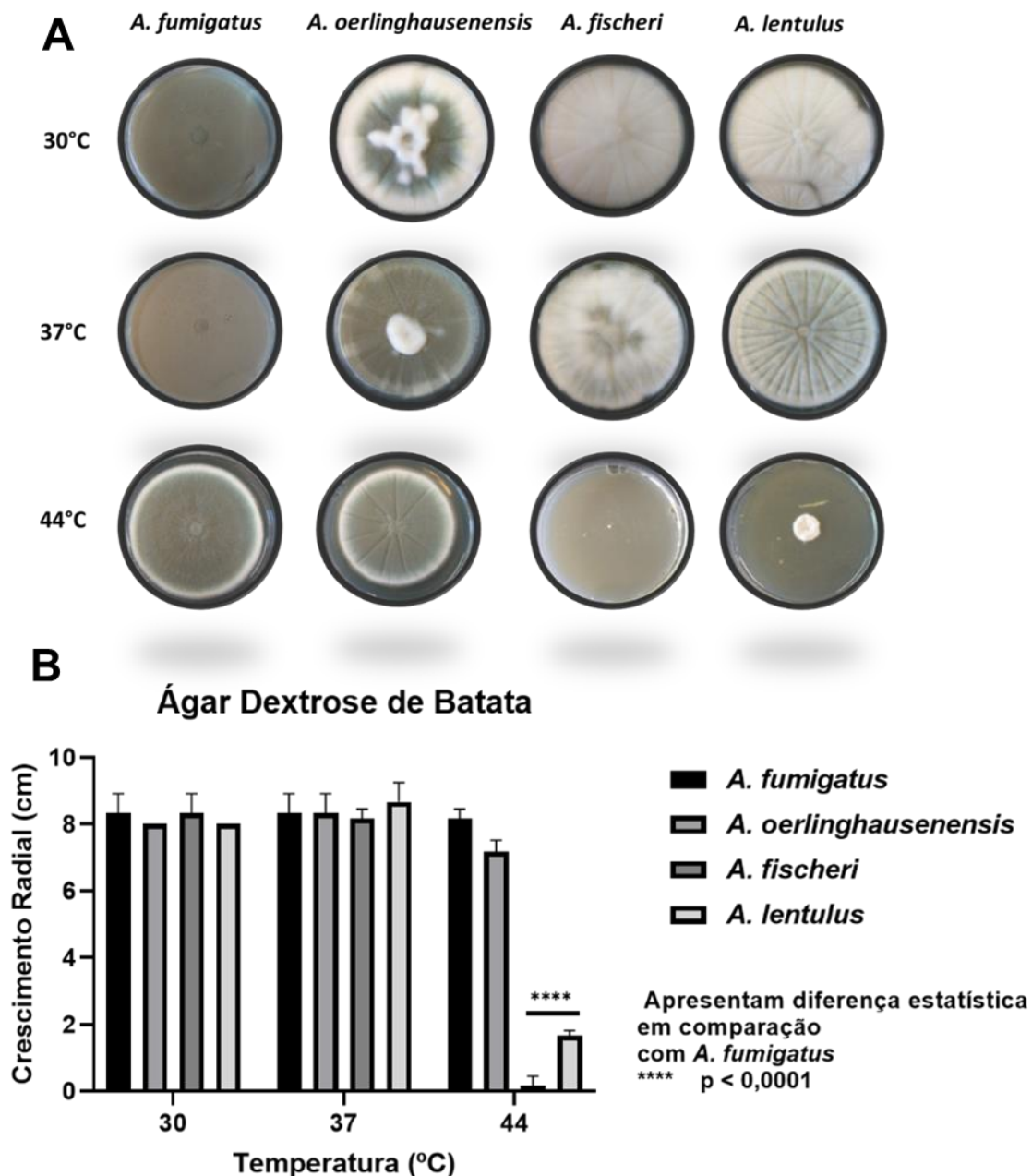


Figura 2: Perfil de crescimento radial das espécies de *Aspergillus* em Ágar Dextrose de Batata **A.** Análise do crescimento radial das cepas de interesse em meio de PDA. ANOVA de dois fatores para a comparação de dois fatores comparando o crescimento das espécies após cinco dias de cultivo em três temperaturas diferentes. **B.** Histogramas com os dados, apontadas diferenças em relação ao crescimento de *A. fumigatus*.

Pode-se notar que a presença de um meio mais rico em nutrientes, igualou o crescimento das quatro espécies a 30°C e 37°C, o que indica que abundância de nutrientes disponíveis pode ser suficiente para suprir o impacto da temperatura a 37°C. O mesmo não pode ser dito para as espécies *A. fischeri* e *A. lentulus*, ($0,16\text{cm} \pm 0,2$ e $1,6\text{cm} \pm 0,12$, respectivamente) que em 44°C demonstraram uma maior sensibilidade, quando comparados com *A.*

fumigatus (8,1cm ± 0,23). Curiosamente, a espécie *A. oerlinghausenensis* teve crescimento comparável ao de *A. fumigatus* em todas as temperaturas, mostrando-se bastante tolerante também a 44°C (7,16cm ± 0,28) apesar de tratar-se de uma espécie relatada como não virulenta. Também foi realizada contagem do número de esporos presentes em amostras iguais das placas de todas as espécies e em todas as três temperaturas com PDA modificado, como mostrado na figura 3.

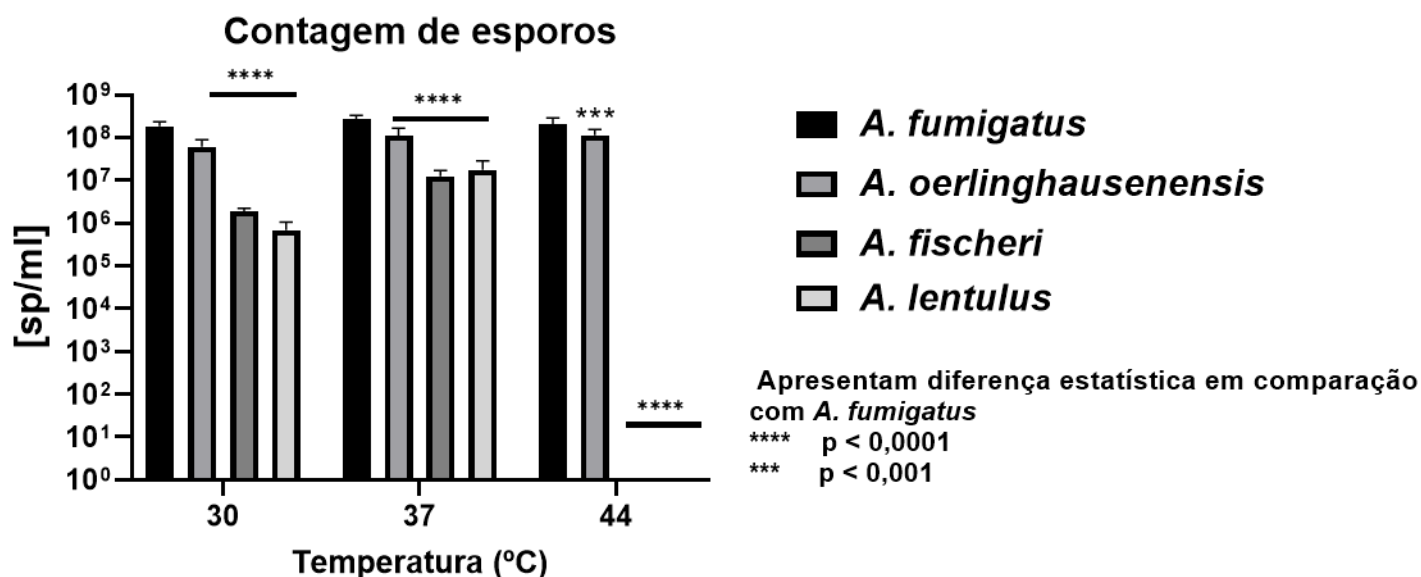


Figura 3: Histogramas com a quantificação de esporos das espécies de *Aspergillus* em Ágar Dextrose de Batata. Histogramas com a contagem de esporos, apontadas diferenças em relação a *A. fumigatus*, também analisado via ANOVA de dois fatores.

A composição desse meio de cultura além de favorecer o crescimento, também permite maior esporulação, o que facilita a definição da abundância de esporos. Após a medição do crescimento radial de cada uma das placas, todas tiveram três pontos de 17,5mm² equidistantes coletados com ponteiras p1000 estéreis, homogêneos, diluídos e contados, como mostra a figura 3. *A. fumigatus* apresentou uma média de concentração de esporos maior que as outras três espécies em todas as três temperaturas testadas (30°C, 37°C e 44°C). Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que indicam que a grande quantidade de esporos produzidos por *A. fumigatus* contribui para que essa espécie seja a mais frequente em casos de aspergilose invasiva (AGARWAL et al., 2013; KOSMIDIS; DENNING, 2015). A capacidade de produzir esporos em grande quantidade favorece a detecção de conídios em praticamente qualquer tipo de ambiente, o que também aumenta sua

capacidade de virulência, uma vez que quanto maior o número de esporos inalados por hospedeiros, maior o desafio para o sistema imune ao lidar com as ameaças, aumentando a probabilidade do desenvolvimento de quadros clínicos como a ABPA e a AI (AGARWAL et al., 2013; KOSMIDIS; DENNING, 2015).

Após as observações relatadas nos experimentos anteriores foram iniciados testes com outros meios de cultura, que levam em sua composição diferentes concentrações e formas disponíveis de nutrientes fundamentais para o desenvolvimento, como carbono e nitrogênio. Os meios contendo soro fetal bovino (SFB) inativado 10% (v/v) e beef extract 1% (p/v), possuem em sua composição, compostos normalmente utilizados como fontes secundárias de obtenção de carbono e nitrogênio por *A. fumigatus*, simulando o tecido epitelial de hospedeiro. Isso torna possível o teste de crescimento radial comparando as diferentes espécies em meios semelhantes ao epitélio pulmonar (BASTOS et al., 2020; PEREZ-CUESTA et al., 2021; RIES et al., 2021). Os resultados dos testes de crescimento radial, feitos da mesma forma que os testes anteriores, mudando-se apenas o meio de cultura testado, estão apresentados nas Figuras 4 e 5.

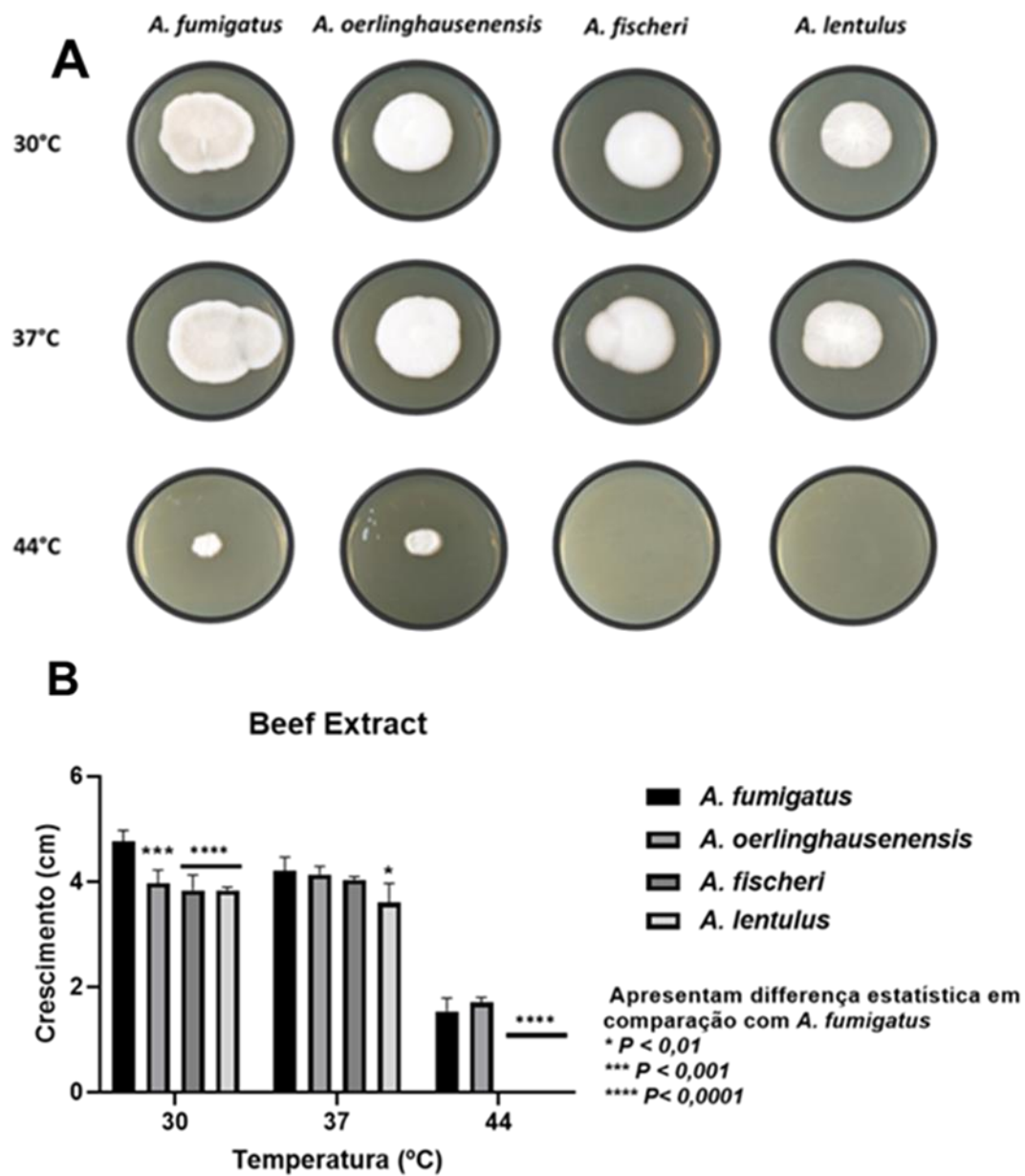


Figura 4: Perfil de crescimento radial das espécies de *Aspergillus* em *Beef Extract Agar*. **A.** Análise do crescimento radial das cepas de interesse em meio de cultura *Beef Extract* sólido. ANOVA para a comparação de dois fatores comparando o crescimento das espécies após cinco dias de cultivo em três temperaturas diferentes. **B.** Histogramas com os dados, apontadas diferenças em relação ao crescimento de *A. fumigatus*.

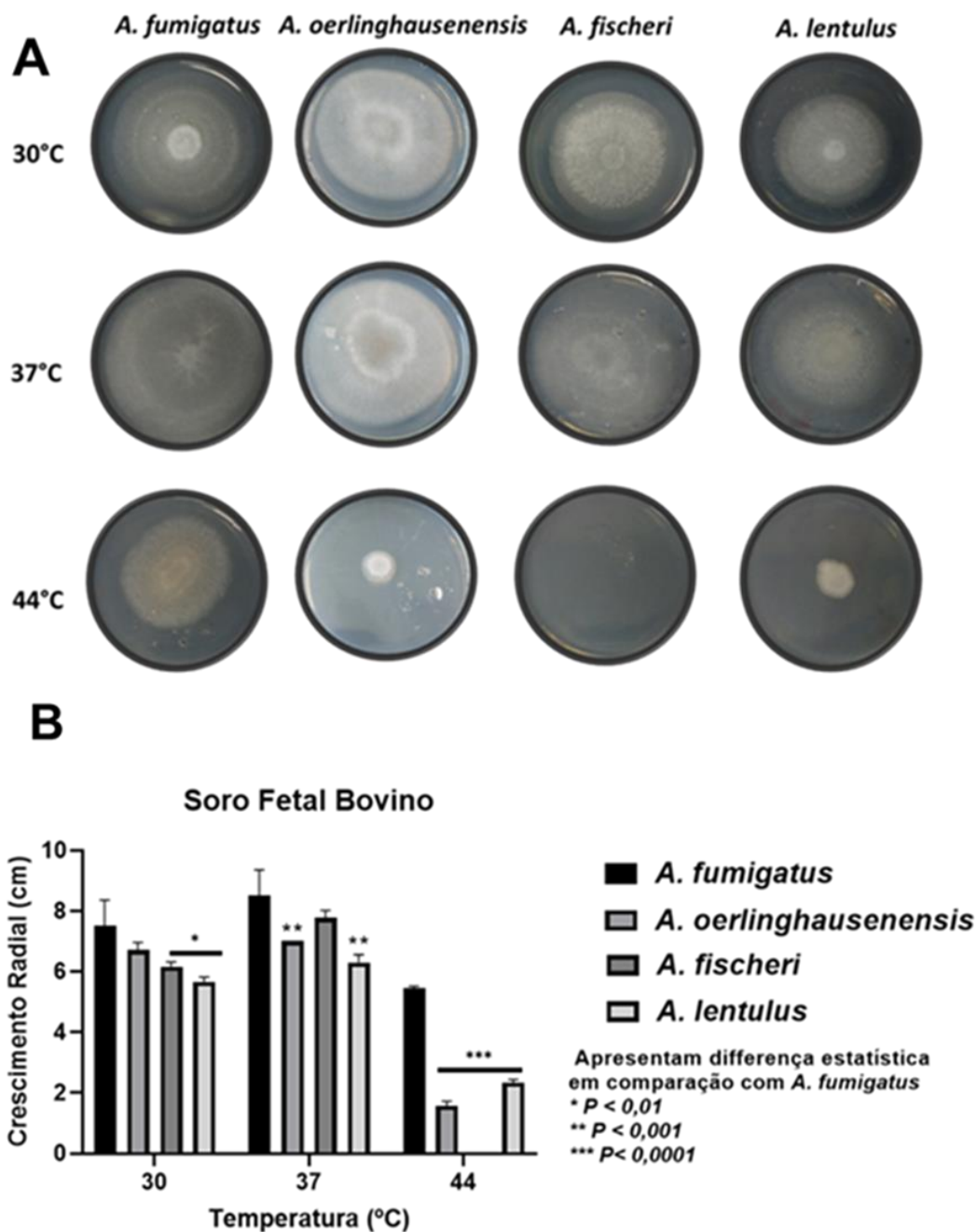


Figura 5: Perfil de crescimento radial das espécies de *Aspergillus* em Ágar com Soro Fetal Bovino. **A.** Análise do crescimento radial das cepas de interesse em meio de cultura ágar + SFB sólido. ANOVA para a comparação de dois fatores comparando o crescimento das espécies após cinco dias de cultivo em três temperaturas diferentes. **B.** Histogramas com os dados, apontadas diferenças em relação ao crescimento de *A. fumigatus*.

Os resultados das figuras 4 e 5 apontam para um melhor desempenho de *A. fumigatus* nesses meios sólidos de maneira geral. Conforme demonstrado, quando as cepas foram crescidas em meio beef extract (Figura 4A), o qual é composto principalmente por aminoácidos, elastina e colágeno

como fontes de carbono e nitrogênio, *A. fumigatus* demonstrou maior crescimento ($4,7\text{cm} \pm 0,16$) que as outras 3 espécies a 30°C . Esses dados indicam que, diferente do que foi observado em meio mínimo, *A. fumigatus* cresce melhor em *Beef Extract Agar*, mesmo em temperatura ambiente, o que indica que essa espécie possui adaptações para obter nutrientes essenciais a partir dessas fontes de carbono e nitrogênio (Figura 4B). Curiosamente, esse fenótipo não é observado a 37°C , temperatura média encontrada dentro do corpo humano, onde apenas *A. lentulus* apresentou crescimento significativamente menor que *A. fumigatus* ($3,6\text{cm} \pm 0,29$ e $4,2\text{cm} \pm 0,21$ respectivamente). Já em condições que mimetizam o estado febril do hospedeiro e composteiras (44°C), as espécies *A. fischeri* e *A. lentulus* não apresentaram qualquer tipo de crescimento, revelando novamente um limite em suas capacidades de termotolerância. Assim como observado anteriormente, *A. oerlinghausenensis* ($1,7\text{cm} \pm 0,08$) se mostrou tão tolerante termicamente quanto *A. fumigatus* ($1,5\text{cm} \pm 0,2$), apesar de não se tratar de uma espécie virulenta.

O crescimento em meio de cultura suplementado com SFB 10% (v/v) (Figura 5A) simula condições encontradas no plasma sanguíneo, e conseqüentemente, na camada epitelial pulmonar, contendo lipídeos, hormônios e outros compostos que servem como fonte de energia e crescimento para células. Quando as cepas foram incubadas a 30°C , novamente *A. fumigatus* apresentou crescimento significativamente maior ($7,5\text{cm} \pm 0,7$) do que *A. fischeri* ($6,1\text{cm} \pm 0,12$) e *A. lentulus* ($5,6\text{cm} \pm 0,12$).

À 37°C , as espécies demonstraram um perfil de crescimento semelhante ao observado a 30°C , com a diferença de que as espécies com crescimento significativamente menor foram *A. oerlinghausenensis* ($7\text{cm} \pm 0$) e *A. lentulus* ($6,3\text{cm} \pm 0,21$), indicando uma possível preferência pela temperatura de 37°C na espécie *A. fischeri* ($7,7\text{cm} \pm 0,2$), nas condições testadas. O resultado mais impactante, porém, foi em relação aos testes a 44°C onde *A. fumigatus* ($5,4\text{cm} \pm 0,04$) apresentou maior vantagem do que as observadas nas outras duas temperaturas, e dessa vez, superando todas as outras 3 espécies testadas (Figura 5B).

Esses resultados sugerem que *A. fumigatus* parece ter maior resistência a estresses térmicos nas mais diversas situações incluindo meios que simulam

compostos encontrados no corpo do hospedeiro. Como já observado (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021), a maior eficiência e flexibilidade metabólica de *A. fumigatus* em obter e utilizar diferentes compostos para a geração de energia e a síntese de material celular, indica um aparato bioquímico e molecular mais eficiente e adaptado aos diversos desafios e mudanças encaradas por essa espécie durante o processo de colonização de um hospedeiro humano, o que inclui não somente a eficiência em adquirir nutrientes de formas e fontes alternativas, como também a maior termotolerância dessa espécie. Os resultados indicados nas figuras 4 e 5, demonstram que ambos os fatores, versatilidade/adaptação bioquímica, e termotolerância, são extremamente importantes, não só para garantir a sobrevivência, como a predominância (maior crescimento) de *A. fumigatus* ao colonizar um determinado ambiente.

4.1.2. Em meio líquido, *Aspergillus spp.* apresentam padrões de crescimento variados em diferentes meios de cultura

Após feitas as caracterizações de crescimento radial em meio sólido, buscando entender melhor se *A. fumigatus* possui maior crescimento que as outras três espécies em termos de massa seca, foram feitos ensaios de crescimento em meio líquido contendo fontes alternativas de carbono a 37°C, seguidas de análises de peso seco dos micélios coletados. Os ensaios de peso seco em meio líquido são importantes, tanto para avaliar o crescimento das espécies em termos de biomassa produzida, quanto para avaliar o desempenho de cada espécie quando em contato com um substrato não sólido, onde há maior facilidade na obtenção e metabolização dos nutrientes disponíveis no meio. Os ensaios foram executados de acordo com (BASTOS et al., 2020), conforme mostra a Figura 6.

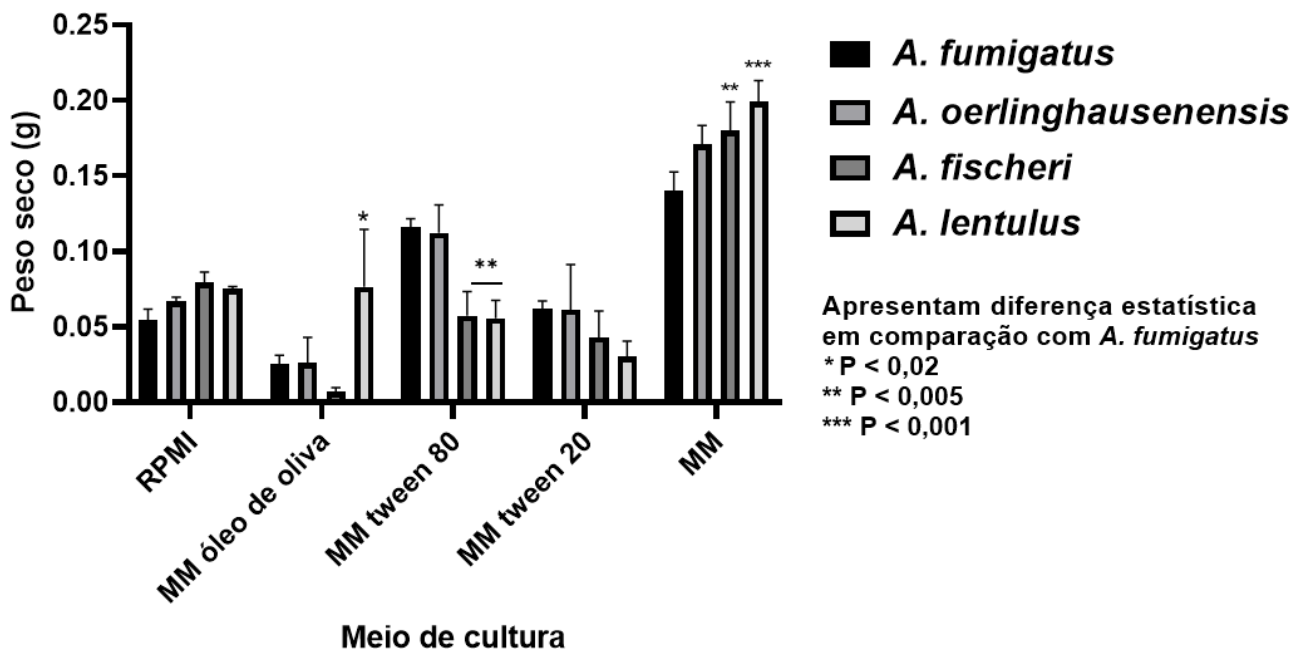


Figura 6: Peso seco após cultivo em diversos meios de cultura líquidos ANOVA de dois fatores comparou as amostras de peso seco das quatro espécies após 72h de cultivo, a 37°C, em diversos meios de cultura. Apontadas diferenças em relação a *A. fumigatus*.

Os resultados apresentados na Figura 6 mostraram que não houve diferença significativa no peso seco das amostras cultivadas por 72h em meio RPMI 1640 + MOPS, o qual simula condições encontradas no plasma de organismos hospedeiros. Também foram feitos testes com amostras crescidas em meios de cultura contendo fontes de carbono alternativas, como os lipídeos Tween 20 (mistura de ácido láurico, ácido palmítico e ácido mirístico), Tween 80 (contém principalmente oleato) e óleo de oliva (triacilglicerol e ácidos graxos livres). Ao comparar o peso seco das amostras cultivadas em Tween 20, assim como no meio RPMI + MOPS, não foram observadas diferenças em relação ao crescimento de *A. fumigatus* com relação às outras espécies. Já as amostras crescidas em Tween 80 demonstraram um padrão de crescimento diferente, onde houve um menor crescimento das espécies *A. fischeri* e *A. lentulus*, em comparação com *A. fumigatus*. As amostras contendo apenas Óleo de Oliva mostraram apenas um maior crescimento de *A. lentulus* em comparação com *fumigatus*. Curiosamente, *A. fumigatus* apresentou os menores índices de crescimento ($0,14g \pm 0,01$) nos testes realizados em meio mínimo contendo

apenas a glicose, a fonte preferencial de obtenção de carbono e energia, por parte dos fungos, apresentando valores significativamente menores que as espécies *A. fischeri* ($0,18g \pm 0,01$) e *A. lentulus* ($0,2g \pm 0,01$) de acordo com os testes ANOVA de dois fatores realizados. Esses resultados indicam que existe uma grande diversidade entre as preferências de cada espécie em utilizar as diferentes fontes de carbono disponíveis no ambiente. Também é importante destacar que, diferentemente dos testes realizados em meio sólido, quando em meio líquido *A. fumigatus* não foi a espécie com maior crescimento observado em meio contendo unicamente glicose como fonte de carbono, indicando uma possível preferência de *A. fumigatus*, ou uma maior dificuldade por parte das outras espécies, em substratos sólidos e mais estáveis. Também foi possível observar um melhor desempenho de *A. fumigatus* e *A. oerlinghausenensis* ao crescer utilizando principalmente o oleato (tween 80) como fonte alternativa de carbono, indicando que essas espécies desenvolveram vias metabólicas mais eficientes em obter e utilizar essas fontes alternativas de carbono do ambiente, ao longo de sua história evolutiva. Esse resultado pode ser um indício de que as vias metabólicas responsáveis por metabolizar oleato também podem exercer papéis importantes em um cenário de colonização de hospedeiro humano.

Quando tomados em conjuntos todos os resultados que foram apresentados até o momento, pode-se dizer que existem características muito particularidades em cada uma das espécies analisadas, tanto com relação ao tipo de cultivo (em meio sólido ou líquido), ou em relação às fontes de carbono e nitrogênio disponíveis no meio, além da temperatura. Em suma, os resultados sugerem que cada espécie apresenta um padrão distinto e peculiar de consumo e crescimento nas mais variadas formas de crescimento e fontes energéticas aqui testadas. Esses resultados, quando olhados em conjunto, sugerem uma maior adaptabilidade de *A. fumigatus* a essas diversas variáveis. Esses atributos podem ser muito importantes para a sobrevivência da espécie e explicam seu maior sucesso, quando comparado com outras espécies de *Aspergillus*, em processos de colonização dos mais diversos ambientes, incluindo também, a capacidade patogênica observada (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; NIERMAN et al., 2005; PEREZ-CUESTA et al., 2021).

4.1.3. Diferenças entre tamanho de esporos não aparentam importância quanto ao fator virulência

Visando a comparação e a caracterização das cepas utilizadas nesse estudo, foram feitas fotografias de 100 esporos produzidos por cada espécie crescidas no meio PDA modificado, via microscopia. Os esporos foram medidos, comparados, e os dados estão ilustrados pelo gráfico em box-plot representado na Figura 7

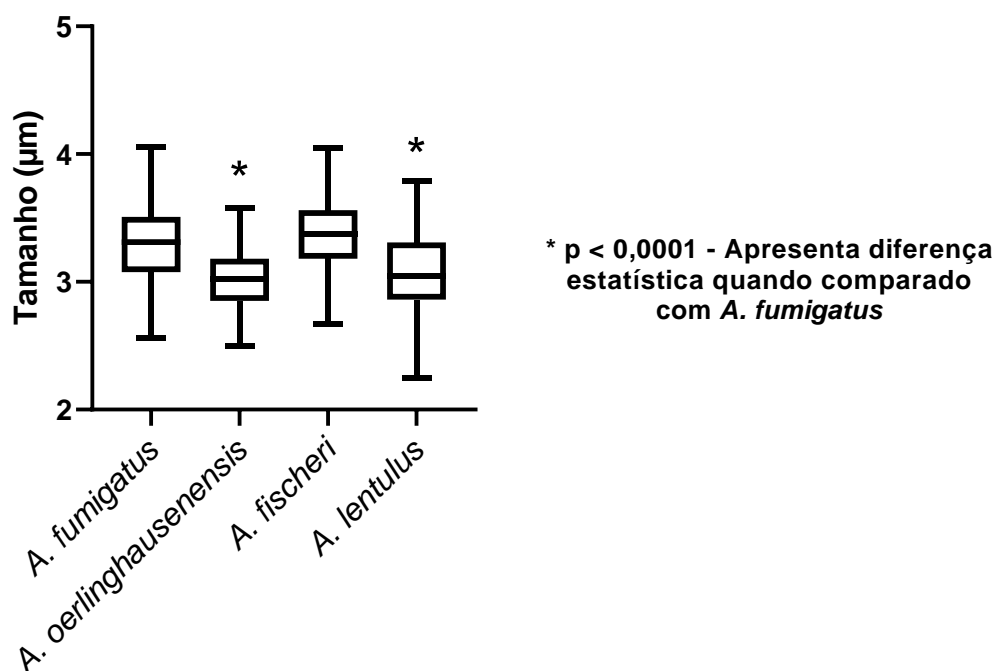


Figura 7: Tamanho médio de esporos produzidos por cada espécie, analisados via captura de imagens de microscopia e medição através AxioVision software v.3.1. ANOVA comparou as amostras de esporos. Apontadas diferenças em relação a *A. fumigatus*.

A. fumigatus, principal patógeno dentre as espécies aqui estudadas, apresenta esporos de tamanho semelhante aos da espécie *A. fischeri*, que não é considerada como virulenta (Figura 7). Corroborando com essa discussão, os dados referentes à outra espécie reportada como virulenta utilizada nesse estudo, *A. lentulus*, possui esporos de tamanho comparável aos esporos da outra espécie não virulenta desse estudo, *A. oerlinghausenensis*. Sobre esses resultados, pode-se dizer que as diferenças e semelhanças encontradas entre o tamanho dos esporos das quatro espécies, provavelmente não é um fator determinante quanto à capacidade de colonizar, ou não, um hospedeiro.

4.1.4. *A. fumigatus* apresenta melhor desempenho ao se adaptar a danos na parede celular

Ainda buscando por possíveis explicações das causas diretas, e indiretas, da maior patogenicidade observada pela espécie *A. fumigatus*, as quatro espécies foram avaliadas em relação às suas capacidades de lidar com a presença de compostos responsáveis por causar dano à parede celular, como CSP, *Congo Red* (CR) e *Calcofluor White* (CFW). Como já discutido, CSP é uma droga recentemente descoberta, a qual pertence à classe das equinocandinas. Seu mecanismo e ação se baseia na inibição não-competitiva da enzima 1,3- β -D-glucano sintase, que é responsável pela assimilação de polímeros de β -D-glucano, perturbando, portanto, a integridade da parede celular fúngica (ONISHI et al., 2000). CSP é recomendada como um medicamento secundário em casos de aspergilose pulmonar, mesmo que em *A. fumigatus* seu efeito seja apenas fungistático, e não fungicida (WALSH et al., 2008).

A respeito dos compostos *Congo Red* (CR) e *Calcofluor White* (CFW), é sabido que atuam como agentes intercalantes e perturbadores da parede celular, que diferentemente da CSP, ligam-se às cadeias de glucano e quitina, respectivamente, quando essas são recém-sintetizadas pelos fungos, impedindo a ligação dessas moléculas com outras moléculas formadoras da parede celular, como β -1,3-glucano e β -1,6-glucano, enfraquecendo a parede celular e comprometendo o crescimento fúngico através dessas duas diferentes vias (BASTOS et al., 2022). Por esse motivo, as espécies fúngicas estudadas foram submetidas ao crescimento na presença de MM sólido acrescido de CSP, CR e CFW nas concentrações indicadas nas figuras 8, 9 e 10, respectivamente.

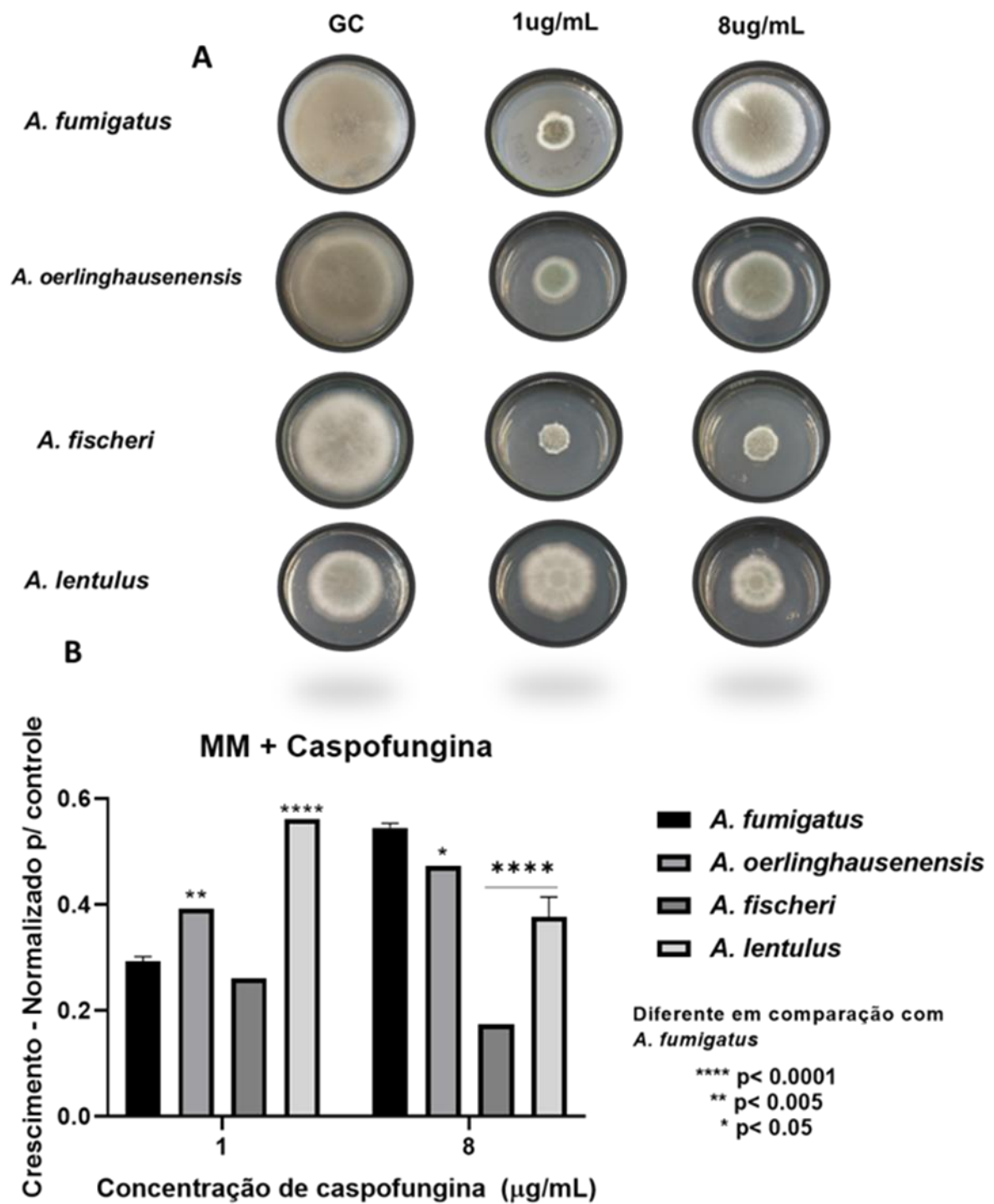


Figura 8: Avaliação do efeito paradoxal sob presença de caspofungina **A.** Placas com os resultados de cinco dias de crescimento radial em MM comum e MM + caspofungina em duas concentrações diferentes. **B.** Histogramas com as médias e desvio padrão do crescimento. Foi feita ANOVA de dois fatores para avaliar diferenças entre as espécies e tratamentos.

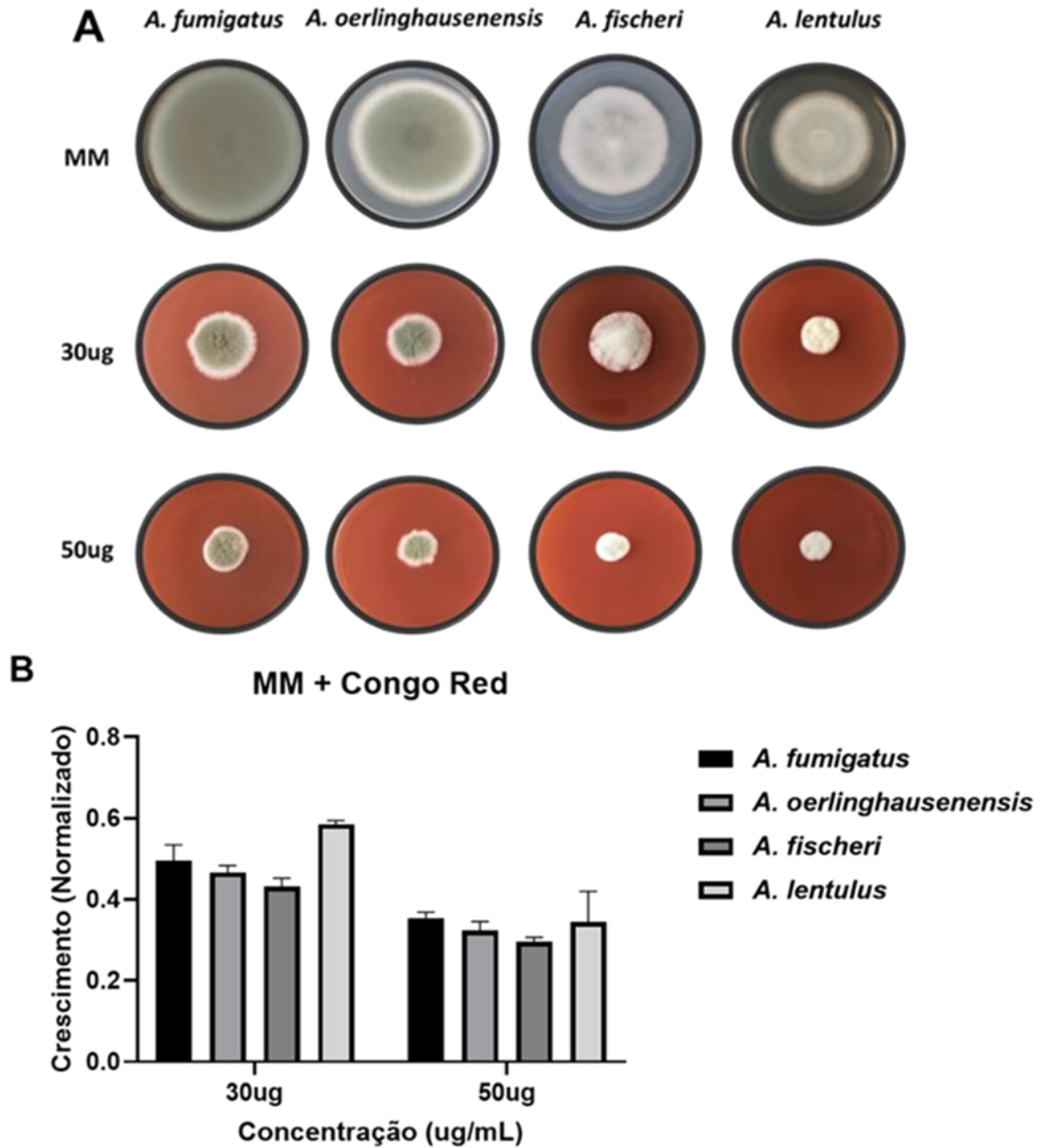


Figura 9: Avaliação de crescimento radial na presença de Congo Red A. Placas com os resultados de cinco dias de crescimento radial em MM comum e MM + congo red em duas concentrações diferentes. B. Histogramas com as médias e desvio padrão do crescimento. Foi feita ANOVA de dois fatores para avaliar diferenças entre as espécies e tratamentos.

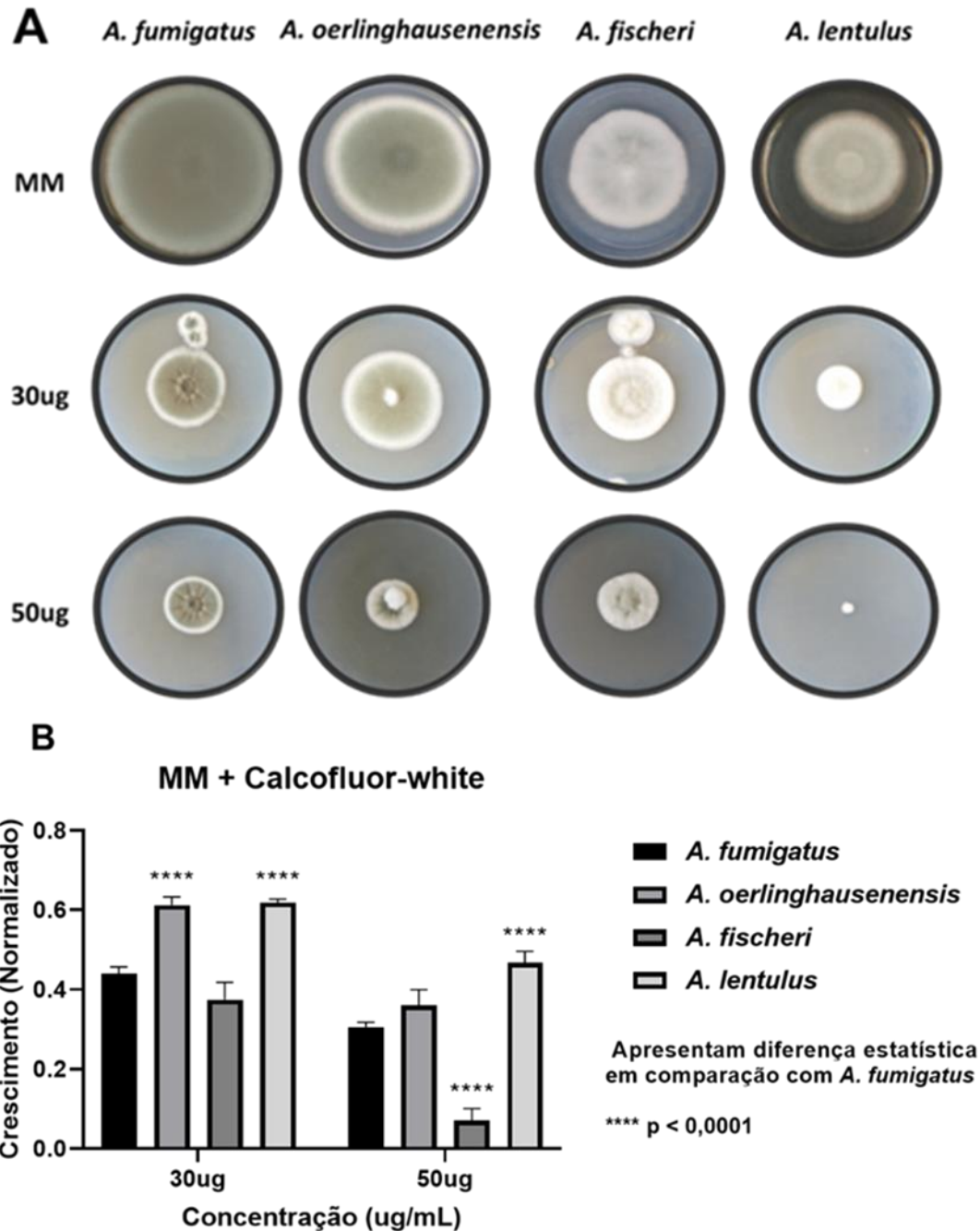


Figura 10: Avaliação de crescimento radial na presença de *calcofluor-white*. **A.** Placas com os resultados de cinco dias de crescimento radial em MM + *calcofluor-white*. **B.** Histogramas com as médias e desvio padrão do crescimento. Foi feita ANOVA de dois fatores para avaliar diferenças entre as espécies e tratamentos.

Conforme mostra a Figura 8, a presença de grandes concentrações [8µg/mL] de CSP faz com que *A. fumigatus* apresente uma maior taxa de crescimento do que em concentrações mais baixas [1µg/mL], demonstrando, portanto, o já discutido CPE (ZHAO et al., 2022). Quando comparando com as outras três espécies aqui testadas, *A. fumigatus* apresenta o maior crescimento ($0,58 \pm 0,01$ normalizado pelo controle sem droga) em concentrações mais

altas. Porém, ao se comparar as quatro espécies, é possível notar que *A. oerlinghausenensis* ($0,34 \pm 0,001$) e *A. lentulus* ($0,61 \pm 0,02$) possuem maior resistência que *A. fumigatus* em concentrações mais baixas [$1\mu\text{g/mL}$] da droga. A maior resistência de *A. fumigatus* a concentrações maiores da droga indica uma melhor capacidade dessa espécie de se adaptar, sendo capaz até de reordenar a parede celular, e substituir componentes como β -1,3-glucano e β -D-glucano, que tem sua produção inibida pela ação de CSP, por quitina. (STEINBACH; LAMOTH; JUVVADI, 2015; WAGENER; LOIKO, 2018). Esses resultados apontam que *A. fumigatus* possui uma melhor capacidade de reordenar a parede celular, e substituir componentes como β -1,3-glucano e β -D-glucano por quitina de maneira mais eficiente, quando lidando com grandes quantidades de droga presente no meio, em comparação com as outras 3 espécies aqui testadas (STEINBACH; LAMOTH; JUVVADI, 2015; WAGENER; LOIKO, 2018).

Como indicado na figura 9, quando as espécies cresceram na presença de CR, não foram observadas diferenças significativas em termos de crescimento radial. No entanto, em presença de CFW, *A. oerlinghausenensis* e *A. lentulus* apresentaram maior crescimento radial demonstrando uma maior resistência dessas espécies frente ao CFW (Figura 10), indicando que ambas as espécies possuem mecanismos de adaptação à perda de moléculas de quitina que são mais eficientes. Esse padrão de crescimento assemelha-se ao perfil de susceptibilidade observado em baixas concentrações de CSP, por exemplo (Figura 8). Em conjunto, esses resultados apontam para uma maior resistência inicial a distúrbios da parede celular vista nas outras espécies de fungos aqui estudadas. Porém, esses resultados também revelam uma capacidade única de *A. fumigatus* de se adaptar a condições mais extremas, como altas concentrações de caspofungina presentes no meio, revelando que os mecanismos por trás da resistência às maiores concentrações de drogas antifúngicas, a maior termotolerância, plasticidade celular e capacidade de se adaptar às mudanças do ambiente podem compartilhar diversos mecanismos em comum, especialmente os ligados às vias de biossíntese e integridade da parede celular reguladas pelas MAPKs (BASTOS et al., 2022; COLABARDINI et al., 2022; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; WAGENER; LOIKO, 2018).

4.1.5. *A. fumigatus* apresenta melhor desempenho ao se adaptar a condições de hipóxia e escassez de ferro

Estudos relatam que o crescimento fúngico em condições de hipóxia está associado com as principais vias metabólicas celulares, como as vias de síntese de esteróis, como o ergosterol, as vias de biossíntese de sideróforos e de respiração mitocondrial. A expressão do fator de transcrição SrbA é induzida tanto em condições de hipóxia, como em situações de escassez de ferro, o que subsequentemente regula as vias de síntese de ergosterol e sideróforos (BLATZER et al., 2011; CHUNG et al., 2014; GRAHL et al., 2012; WILLGER et al., 2008; WILLGER; GRAHL; CRAMER, 2009).

Isso acontece porque o metabolismo de ferro em *A. fumigatus* está coordenado com diversas outras vias metabólicas. O ferro é necessário para as reações que ocorrem em processos relacionados à glicólise, o ciclo de Krebs, na cadeia transportadora de elétrons da respiração mitocondrial, as vias de transdução de sinal coordenadas pela proteína kinase ativada por mitógeno, MpkA, vias de integridade e biossíntese de componentes da parede celular e, por esses motivos, as vias de obtenção de ferro, e conseqüentemente as concentrações intracelulares de ferro são aumentadas quando essas vias metabólicas são estimuladas, como pode ser visto na Figura 11 (BLATZER et al., 2011; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021).

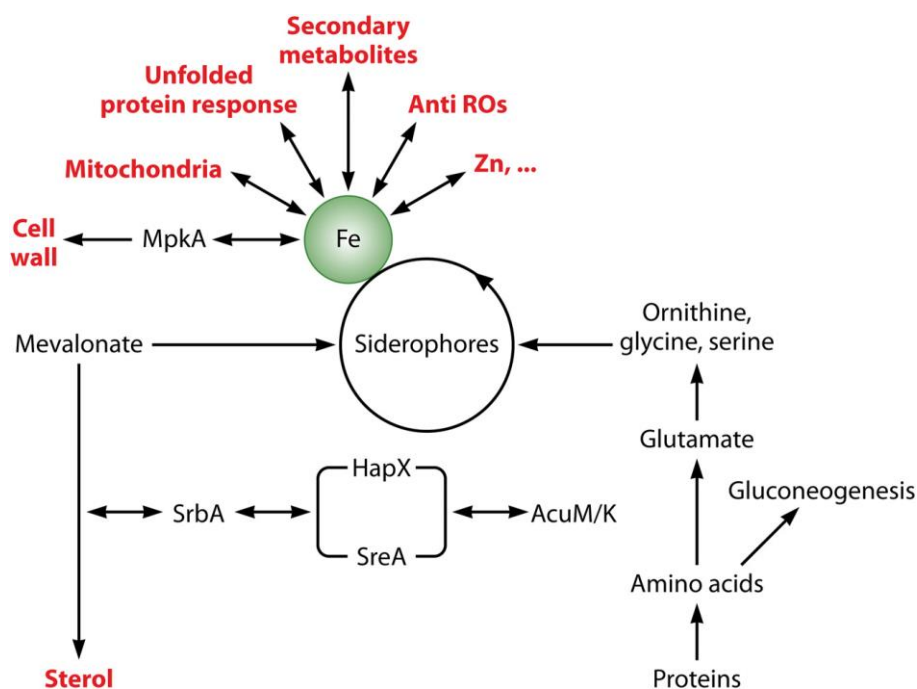


Figura 11: Fonte: Latgé *et al.*, 2020. Mapa resumido das vias de regulação integradas ao metabolismo e regulação das concentrações de ferro intracelulares.

Tendo essas informações em vista, foi feito um experimento de crescimento radial comparando o crescimento de cada uma das quatro espécies avaliadas nesse presente trabalho em ambientes de normóxia e hipóxia para avaliar a performance de cada espécie nessas condições frequentemente encontradas em diversas situações microambientes aonde há infecção por *A. fumigatus*, como por exemplo dentro dos fagolisossomos de macrófagos, ou em meio a camada de biofilme formada pela matriz extra celular secretada pelas células fúngicas enquanto crescem (BASTOS *et al.*, 2021; BOM *et al.*, 2015; KROLL *et al.*, 2014; MANFIOLLI *et al.*, 2018) (Figura 12)

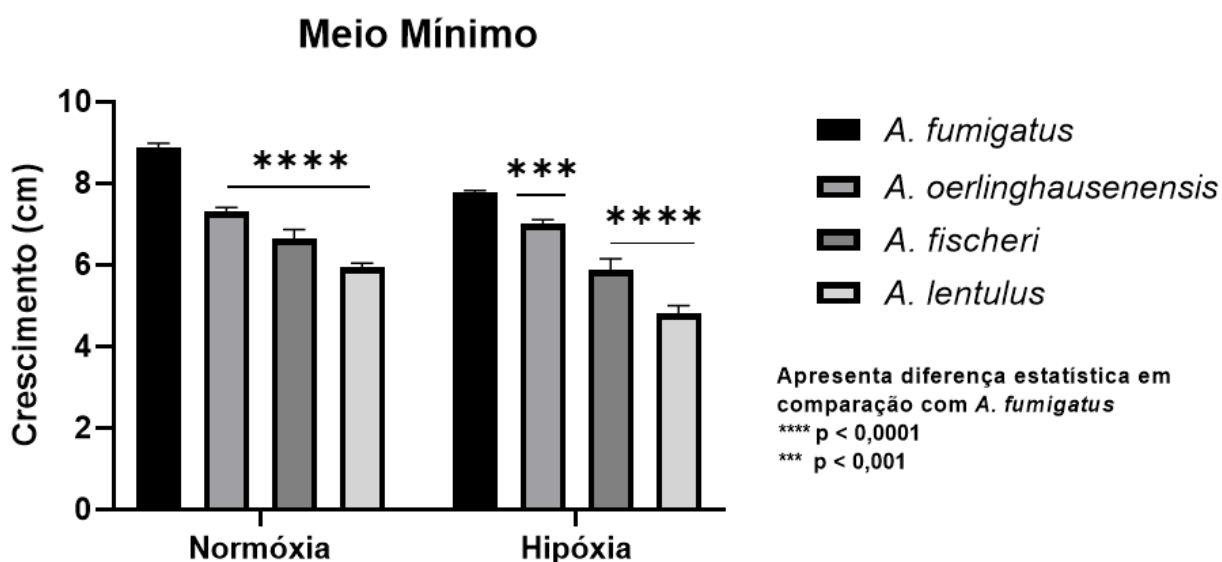


Figura 12: Histogramas contendo os dados do perfil de crescimento radial das espécies de *Aspergillus* em condições de hipóxia e normóxia em meio mínimo sólido. ANOVA de dois fatores para a comparação do crescimento das espécies após cinco dias de cultivo nas duas condições. Apontadas diferenças em relação ao crescimento de *A. fumigatus*.

A Figura 12 mostra que *A. fumigatus* possui melhor desempenho, tanto em condições de normóxia, como em hipóxia, confirmando que, de maneira geral, *A. fumigatus* tem vantagem sobre outros fungos da seção *Fumigati* ao enfrentar ambientes com baixas concentrações de oxigênio, condição frequentemente encontrada durante o processo de colonização de um hospedeiro pelo fungo. Como apontado por estudos anteriores e pelos dados já discutidos no presente estudo, é provável que *A. fumigatus* apresente maior crescimento em condições de hipóxia devido ao seu aparato único de

modulação gênica e adaptação às respostas induzidas por estresses como hipóxia e estresse térmico. A indução das vias de produção de ergosterol, captação de ferro e adaptações nas vias de biossíntese e integridade da parede e membrana celular, tornam possível para *A. fumigatus* realizar a desafiadora tarefa de sobrevivência dentro de um hospedeiro humano (BASTOS et al., 2021; BOM et al., 2015; MANFIOLLI et al., 2018).

Ainda investigando características importantes para a maior virulência de *A. fumigatus* em comparação com as outras três espécies, devido aos já discutidos indícios de que o metabolismo de obtenção e homeostase de ferro estão envolvidos nas vias de termorregulação, adaptações às condições de hipóxia, conseqüentemente impactando os níveis de virulência observados nessa espécie, foram testados meios de cultura com drogas quelantes de ferro (BPS + Ferrozina), mostrados na Figura 13 (BLATZER et al., 2011; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021).

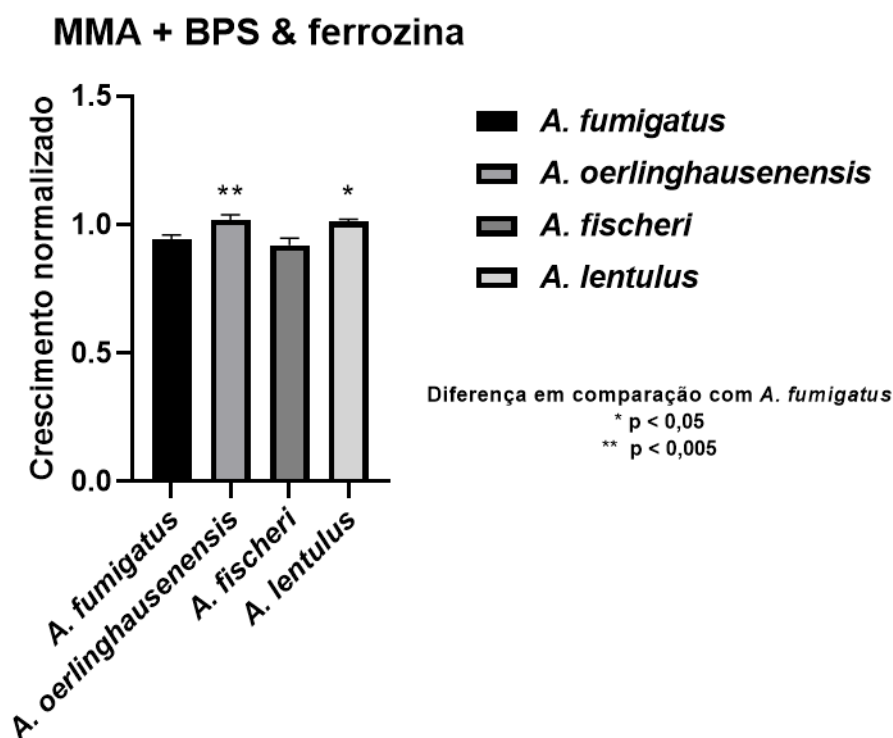


Figura 13: Avaliação de crescimento radial em meio com escassez e quelantes de ferro. Histogramas com os resultados. Foi feita ANOVA para avaliar diferenças entre as espécies a 37°C.

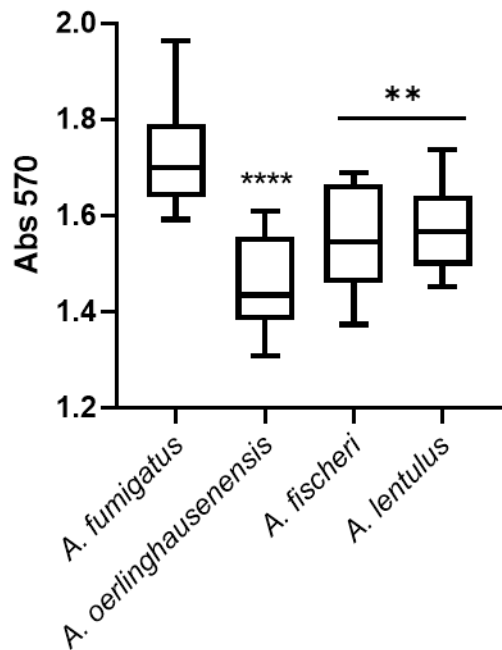
Os resultados da Figura 13 mostram que, em comparação com os controles de crescimento, *A. fumigatus* não possui um maior crescimento quando cultivado em meio rico em glicose, sem ferro, e adição de agentes

quelantes e de ferro (BPS e ferrozina). A captação de ferro pode ser um grande desafio para organismos patogênicos, especialmente durante a germinação de esporos, o que indica que de fato essa espécie possui melhores mecanismos de adaptação a essas condições (BASTOS et al., 2020). Os resultados indicam que *A. oerlinghausenensis* e *A. lentulus* possuem um melhor desempenho que *A. fumigatus*, quando comparados com controles de crescimento. Esses resultados indicam uma boa aptidão das espécies da seção *Fumigati* a ambientes onde ferro é escasso. Esses resultados também indicam que a aptidão aos ambientes onde o ferro é escasso, por si só, não é o suficiente para garantir a sobrevivência de um fungo quando em contato com um organismo hospedeiro.

4.1.6. *A. fumigatus* apresenta maior aderência de biofilme em condições de hipóxia e normóxia

É descrito que durante a infecção *A. fumigatus* é capaz de formar estruturas complexas denominadas biofilmes. Nos biofilmes as células fúngicas se aderem a um substrato, como por exemplo, o epitélio pulmonar, e secretam a MEC a qual é composta principalmente por polissacarídeos. Assim, a MEC oferece uma estrutura de apoio para coesão entre as células e as superfícies, podendo ainda favorecer a retenção de nutrientes essenciais para a sobrevivência, água e contribuir com integridade estrutural e proteção das células do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010; MANFIOLLI et al., 2018). Foi avaliado, *in vitro*, a capacidade de formação e aderência do biofilme de cada uma das espécies fúngicas em condições de hipóxia e normóxia (figura 14). Ambas essas condições podem ser encontradas por esses microrganismos dentro dos pulmões dos hospedeiros e nos microambientes gerados durante o crescimento do microrganismo, a formação de biofilme e em processos de onde há fagocitose de hifas e esporos por macrófagos no decorrer do processo de infecção.

A Biofilme - Normóxia - 24h

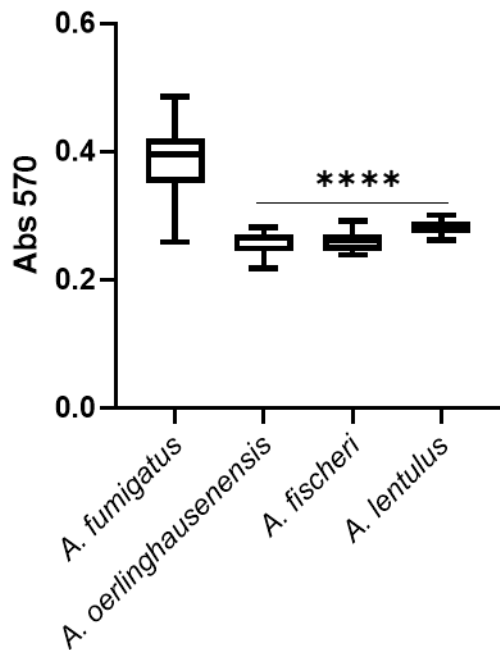


Diferença estatística em comparação com *A. fumigatus*

**** $p < 0.0001$

** $p < 0.01$

B Biofilme - Hipóxia - 24h



Diferença estatística em comparação com *A. fumigatus*

**** $p < 0.0001$

** $p < 0.01$

Figura 14: Avaliação da capacidade de aderência do biofilme em condições de normóxia e hipóxia. Esporos de cada espécie foram inoculados em meio RPMI+Hepes, em placas de poliestireno de 96 poços. Após 24h de incubação em condições de hipóxia e/ou normóxia, a formação do biofilme foi avaliada mediante adição de cristal violeta 0,05% e quantificação em espectrofotômetro. **A.** Dados em normóxia indicam maior aderência das células de *A. fumigatus* ao substrato nessas condições. **B.** Dados em hipóxia indicam maior aderência das células de *A. fumigatus* ao substrato nessas condições. A análise via ANOVA e plotagem dos dados em Box-plot foi feita para avaliar diferenças entre as espécies.

De acordo com os dados obtidos observa-se que *A. fumigatus* foi mais eficaz em aderir ao poliestireno das placas quando comparado com as outras espécies em ambos os casos. A diferença é ainda mais evidente em hipóxia, corroborando com dados anteriores que sugerem que a formação de biofilme parece favorecer a evasão do sistema imune de hospedeiros (BOM et al., 2015; MANFIOLLI et al., 2018). (FLEMMING; WINGENDER, 2010; MANFIOLLI et al., 2018) Em cenários envolvendo a colonização do epitélio pulmonar humano, o biofilme também funciona como uma camada protetora, isolando e protegendo as células fúngicas da ação das células do sistema imune, promovendo também uma maior resistência a tratamentos com drogas antifúngicas (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019).

A partir dos resultados obtidos no experimento ilustrado na figura 14, o fenótipo de maior aderência do biofilme de *A. fumigatus* ao substrato foi investigado em maiores detalhes. Para esse fim, foram feitas imagens de microscopia após 24h de crescimento em condições de hipóxia. A conformação de hifas formadas por cada espécie, bem como o ângulo de crescimento das hifas em relação ao substrato, bem como o volume de biomassa produzido por cada espécie, ao serem cultivadas em hipóxia, foram analisadas e são mostradas na figura 15.

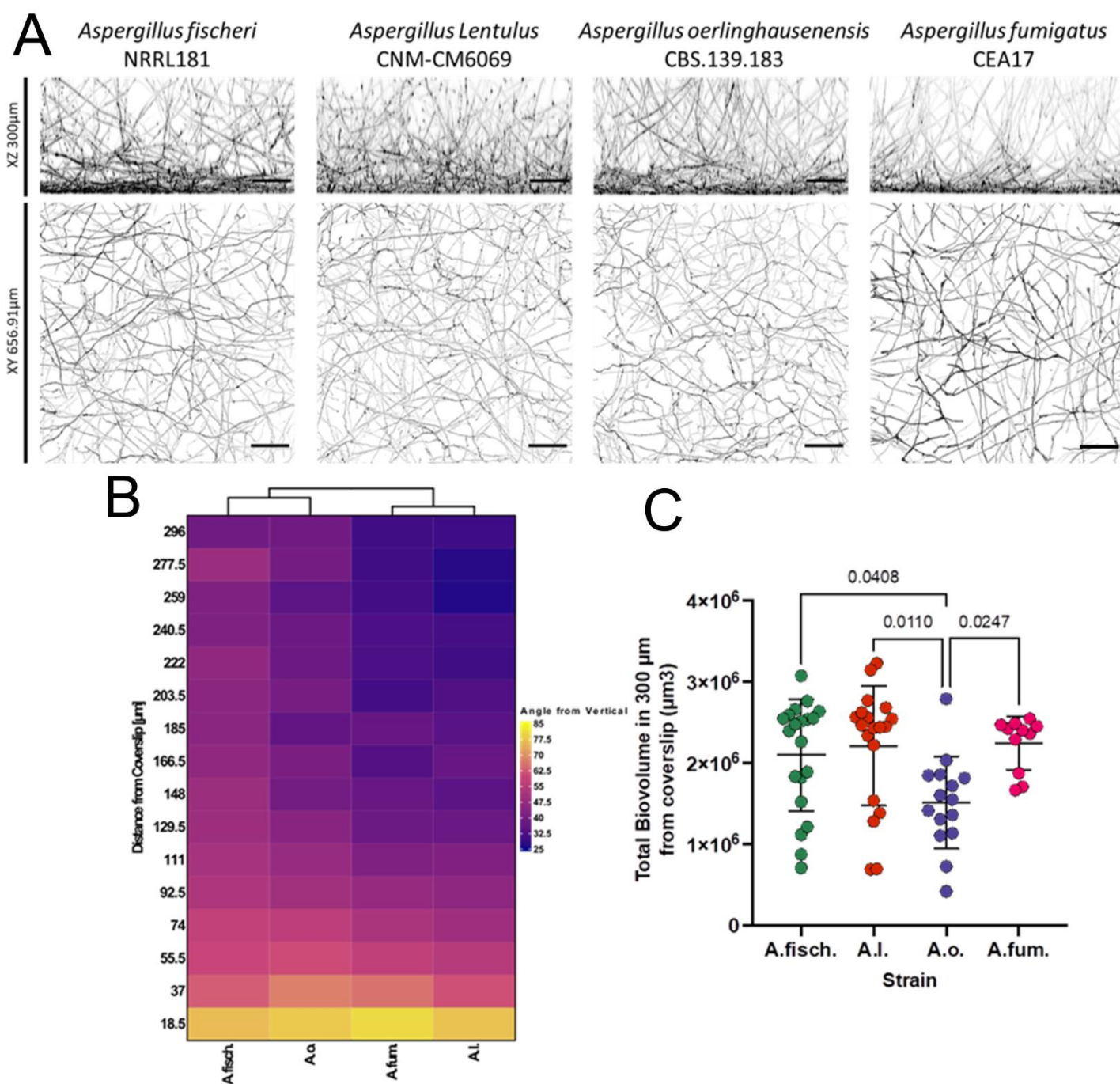


Figura 15: Análises de conformação espacial de hifas, verticalidade de hifas e volume de biomassa produzidos em biofilme de *A. fumigatus* em condições de hipóxia **A.** Avaliação da conformação de biofilme de *Aspergillus spp.* em condições de hipóxia após incubação de 24h a 37°C em condições de hipóxia. Barras de escala equivalem 100µm **B.** *Heatmap* mostrando os índices de verticalidade do crescimento das hifas **C.** Gráfico de pontos analisado via ANOVA mostra as quantidades de biovolume de matriz extracelular formada por cada espécie.

As imagens da microscopia demonstram que de fato não há grandes diferenças com relação à conformação e a verticalidade das hifas durante o crescimento das quatro espécies (Figura 15A e 15B, respectivamente). Os resultados apontados na figura 15C demonstram que *A. oerlinghausenensis* foi

a única espécie em que foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa em relação ao biovolume total produzido, em comparação com *A. fumigatus*. *A. oerlinghausenensis*, apresentou a menor produção de biomassa nesse experimento, quando comparada com todas as outras espécies.

Visto que não foram observadas grandes diferenças entre as espécies quanto ao volume de biomassa e morfologia de colônias formadas, tomando em conjunto os resultados da figura 14 e 15, pode-se inferir que *A. fumigatus* possui maior capacidade de aderência em seus esporos e hifas ao substrato testado (poliestireno). É possível que haja uma maior quantidade de compostos hidrofóbicos, adesinas e moléculas responsáveis por dar maior aderência, como o GAG, nas células e MEC de *A. fumigatus*, em comparação com as outras espécies (BOM et al., 2015; KOWALSKI et al., 2019; MANFIOLLI et al., 2018). Isso explicaria os resultados da figura 11, onde os experimentos de coloração de biofilme com cristal violeta (CV) apontaram uma maior coloração dos biofilmes produzidos pela espécie *A. fumigatus*, tanto em normóxia, como em hipóxia.

4.2. Caracterização de virulência das cepas em modelos *in vivo*

A fim de avaliar o perfil de virulência das quatro espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* estudadas neste projeto, foram realizados experimentos de infecção *in vivo* em modelos de larvas de *Galleria mellonella*. Para tanto, as larvas foram divididas em grupos de 10, cada grupo infectado com esporos de cada espécie e incubadas 14 dias, a 30°C ou a 37°C a fim de mimetizar tanto a temperatura ambiental como de possíveis hospedeiros. Todos os ensaios foram repetidos duas vezes.

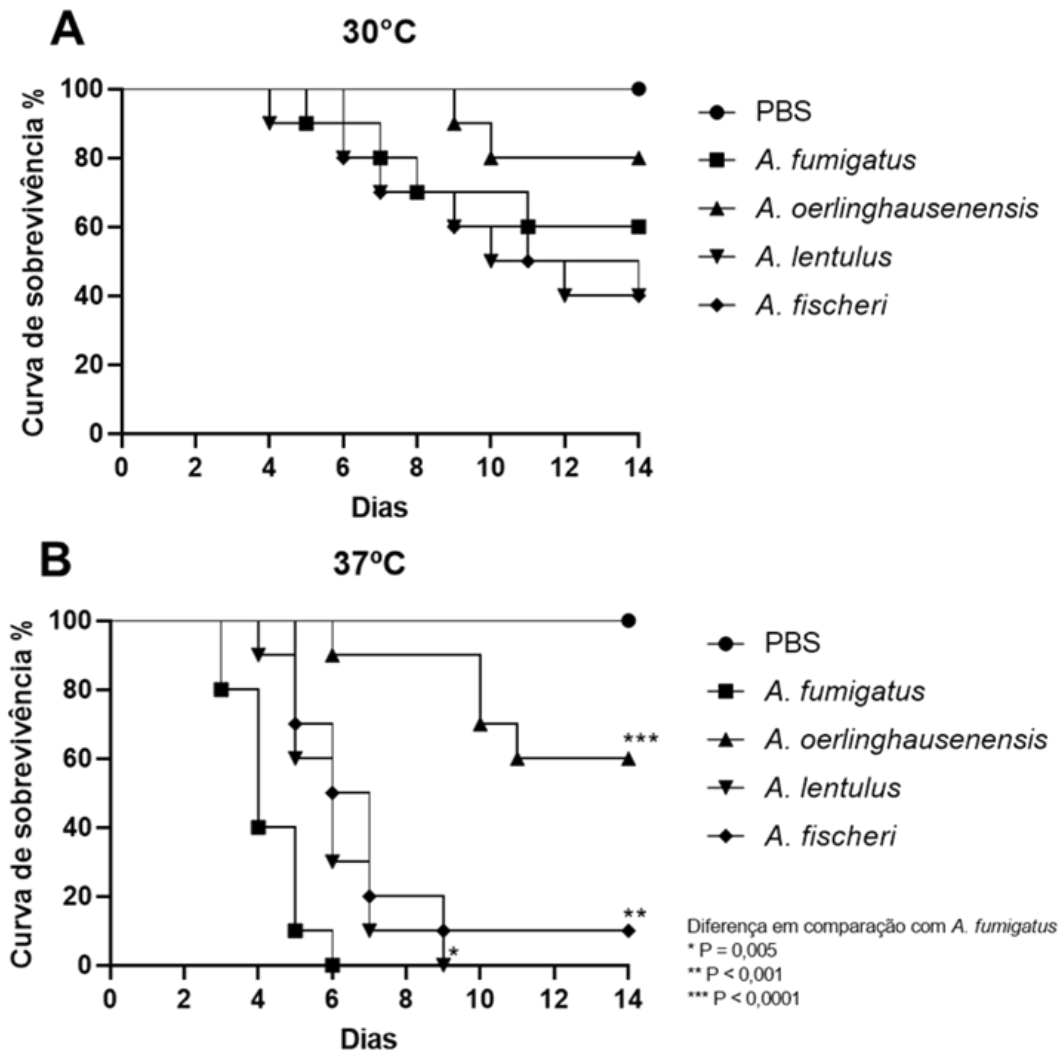


Figura 16: Perfil de virulência das espécies de *Aspergillus* em modelo de infecção de larvas de *G. mellonella*. Análises de Mantel-Cox sobre as curvas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella*. Apontadas diferenças em relação a *A. fumigatus*. **A.** Curvas de sobrevivência a 30°C mostram que não há diferenças entre as quatro espécies testadas **B.** Curvas de sobrevivência a 37°C mostram que há diferenças estatísticas quando comparando *A. fumigatus* e as outras 3 espécies testadas.

Conforme os resultados mostrados na figura 16, quando as larvas foram incubadas à 37°C, *A. fumigatus* reduziu a sobrevivência das larvas, sugerindo uma maior virulência quando comparada com as demais espécies. Isso sugere uma maior virulência dessa espécie em modelo de *G. mellonella*. Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas entre as espécies nos experimentos com incubação a 30°C. Esse resultado, juntamente com os resultados obtidos nos experimentos de crescimento radial em diferentes condições de temperatura, sugere que, de fato, a temperatura e a

termotolerância de *A. fumigatus* parece ser fundamental na maior taxa de virulência observada por essa espécie.

Posteriormente, a patogenicidade de *Aspergillus spp.* Também foi avaliada em modelo quimioterápico de infecção em camundongos, a fim de confirmar também esse padrão de virulência em um cenário de infecção de um mamífero com sistema imune suprimido, condições predominantemente encontradas em casos clínicos de aspergilose invasiva (Figura 17).

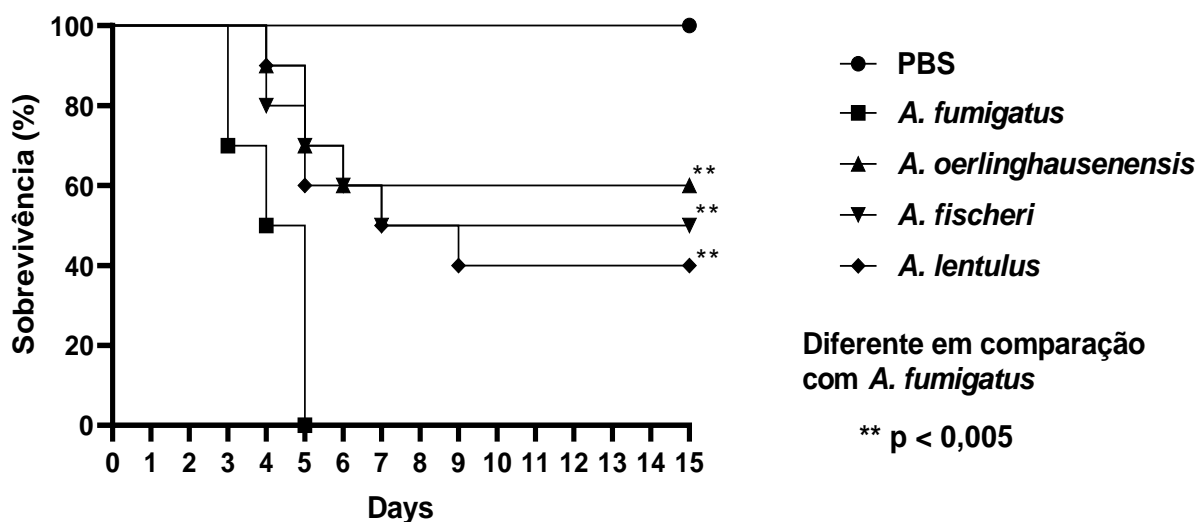


Figura 17: Perfil de virulência das espécies de *Aspergillus* em testes com infecção de camundongos num modelo quimioterápico. Análises de Mantel-Cox sobre as curvas de sobrevivência modelo quimioterápico de infecção em camundongos indicou diferenças significativas entre *A. fumigatus* e as outras 3 espécies testadas.

Os resultados obtidos são apresentados na figura 17 e demonstram que há uma diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevivência dos camundongos infectados com *A. fumigatus*. Há uma notável diferença entre a taxa de sobrevivência dos camundongos infectados com *A. fumigatus* (0%), e camundongos infectados com as outras duas espécies não relatadas como patogênicas, *A. oerlinghausenensis* (60%) e *A. fischeri* (50%). Esses resultados fortalecem a hipótese de que *A. fumigatus* possui maior eficiência em infectar seres vivos de maneira geral devido à sua termotolerância, o que pode se relacionar diretamente aos maiores níveis de patogenicidade descritos para essa espécie (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019).

4.3. Análise transcriptômica para identificação de genes relacionados à termotolerância em *A. fumigatus*

Com o intuito de identificar genes que favorecem a resistência ao estresse térmico e patogenicidade em *A. fumigatus* foi feito um sequenciamento de RNA utilizando as cepas *A. fumigatus* (CEA17), *A. oerlinghausenensis* (CBS139.183) e *A. fischeri* (NRRL 181). O planejamento desse experimento visou simular o crescimento fúngico no meio ambiente (30°C para obtenção dos esporos) seguido de um cenário que mimetizava a germinação em temperatura ambiente (30°C), ou germinação sob temperaturas encontradas no tecido epitelial pulmonar do corpo de um hospedeiro humano (37°C). Assim, esporos das três espécies foram recuperados após 7 dias de incubação à 30°C, simulando a temperatura ambiental. Os esporos de cada espécie foram inoculados em meio líquido, em triplicatas a 30°C e 37°C durante 24 horas. Após extração do RNA e preparo das bibliotecas de cDNA o material foi sequenciado. A análise dos dados gerados possibilitou a identificação de genes com expressão modulada (induzida ou reprimida) de *A. fumigatus* em comparação com as demais espécies crescidas à 30°C e 37°C, bem como de *A. fumigatus* à 37°C em comparação com a mesma espécie germinada à 30°C.

Foram identificados um total de 659 genes, que em valores absolutos do sequenciamento, são mais expressos exclusivamente em *A. fumigatus* e a 37°C. Destes, 599 genes também estão presentes ou em *A. fischeri*, ou *A. oerlinghausenensis* ou em ambos. Apenas 60 genes são exclusivos de *A. fumigatus*, ou seja, não possuem ortólogos em nenhuma das duas outras espécies aqui testadas, como mostra a figura 18.

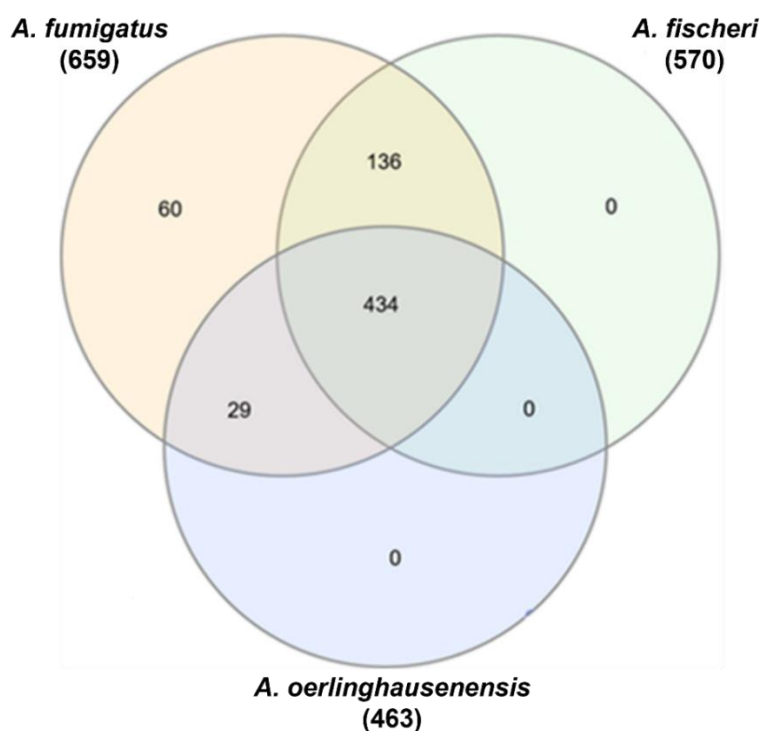


Figura 18: Perfil total de genes induzidos em *A. fumigatus*. Diagrama de Venn indicando o número total de genes induzidos detectados em *A. fumigatus* a 37°C, e seu respectivo número de genes ortólogos encontrados nas outras duas espécies.

Ao filtrar unicamente os genes que com um valor de pelo menos 1 em uma escala de *log 2-fold change* (ao menos duas vezes mais expresso), uma lista final composta de 289 genes classificados como significativamente induzidos (mais expressos) exclusivamente pela espécie *A. fumigatus*, no tratamento de 37°C. Após a realização de buscas em bancos de dados, e de um levantamento bibliográfico, foram encontrados 30 genes (Figura 19) já previamente estudados e portanto, já descritos e nomeados em trabalhos publicados a respeito desta espécie.

É válido ressaltar que esses 30 genes induzidos nesse experimento, apesar de já terem sido descritos em trabalhos anteriores, de maneira geral ainda não foram relacionados como envolvidos exclusivamente em processos relacionados à termotolerância e/ou fundamentais para a virulência, sendo, portanto, alvos de grande interesse. A partir dessa análise, foram identificados 259 genes induzidos pelo tratamento, que não haviam sido previamente caracterizados na literatura, o que sugere que esses genes podem possuir um papel importante na regulação metabólica envolvida em processos de

termotolerância da espécie *A. fumigatus*. Os dados aqui citados estão sumarizados na Tabela 2 e na Figura 19.

Genes induzidos	Quantidade
Total sequenciados	659
<i>Log 2-fold change</i>	289
Não caracterizados	259
Caracterizados	30

Tabela 2: Número de genes induzidos detectados como diferencialmente expressos por *A. fumigatus* a 37°C.

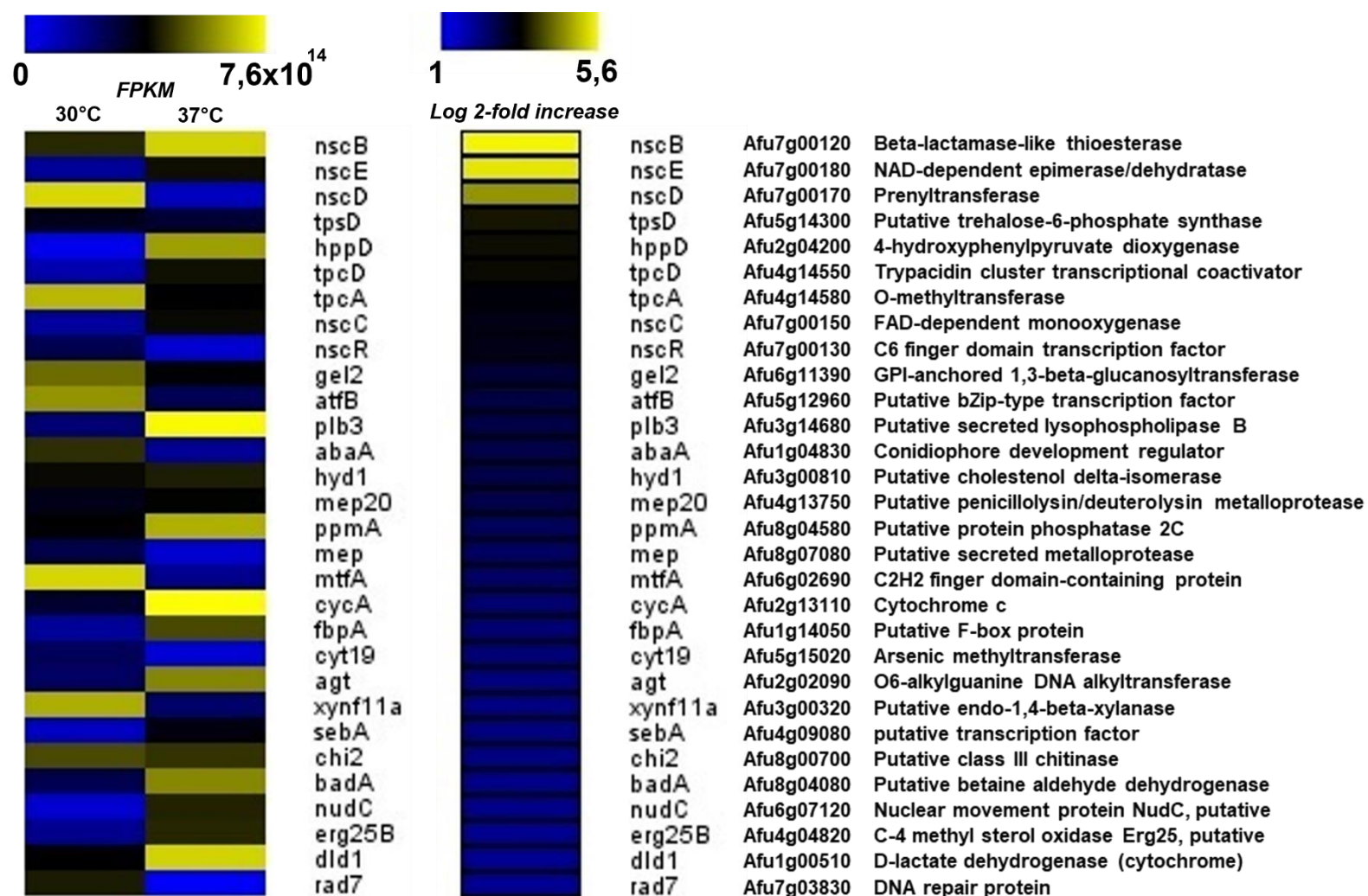


Figura 19: Comparação dos principais genes já descritos na literatura disponível, e detectados como induzidos unicamente em *A. fumigatus* a 37°C pelas análises computacionais do RNAseq (log 2-fold increase ≥ 1). Heatmap gerado a partir dos dados de *fpkm* produzidos pela análise de RNAseq, comparando os níveis de expressão de cada gene a 30°C e 37°C.

A respeito dos genes mais expressos por *A. fumigatus*, podem ser destacados os genes *nscB* (Afu7g00120), *nscE* (Afu7g00180), *nscD* (Afu7g00170), *nscC* (Afu7g00150), *nscR* (Afu7g00130), *tpsD* (Afu5g14300), *hppD* (Afu2g04200), *tpcD* (Afu4g14550), *tpcA* (Afu4g14580), *mep* (Afu8g07080) e *mep20* (Afu4g13750). Especificamente, *nscB* é um gene responsável por codificar uma proteína da família das policetídeo sintase (PKS), a tioesterase metalo- β -lactamase-like, a qual está envolvida na biossíntese de neosartoricina A e fumiciclina A, MSs importantes, e já relacionados com as vias de produção de melanina e no metabolismo de ferro (FUJII et al., 2004; MANFIOLLI et al., 2017; NIERMAN et al., 2005). Em nossa análise transcriptômica esse gene apresentou-se cerca de 11 vezes mais induzido em *A. fumigatus* a 37°C (log 2 fold increase 5,53), o que sugere que esse gene possua um importante papel nas vias metabólicas relacionadas à resposta ao estresse térmico nessa espécie, possivelmente aumentando a capacidade de virulência de *A. fumigatus*.

De forma semelhante ao gene *nscB*, os genes *nscE* (log 2 fold increase 5,33), *nscD* (log 2 fold increase 4,34), *nscC* (log 2 fold increase 2,27) e *nscR* (log 2 fold increase 2,25) também foram induzidos na análise de RNAseq. Esses genes pertencem ao cluster de genes biossintéticos (BSGs) responsável pela síntese de neosartoricina A, sendo o 23º cluster dentre os mais de 26 BSGs envolvidos na produção de MSs já relatados em *A. fumigatus*. (BIGNELL et al., 2016; MANFIOLLI et al., 2017). Já se sabe que esses MSs possuem propriedades citotóxicas e imunomodulatórias importantes para o estabelecimento do fungo no epitélio pulmonar do hospedeiro (BIGNELL et al., 2016). Esses mesmos genes também já foram relacionados com respostas desencadeada por estresse oxidativo, sendo também influenciadores nas vias das proteínas MAPKs, que coordenam as vias de biossíntese e integridade da parede celular (BIGNELL et al., 2016; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; LIND et al., 2017; MATTERN et al., 2015; NIERMAN et al., 2005; THROCKMORTON et al., 2016). Os achados do presente trabalho reforçam a importância desses genes, não somente na produção de MSs, como também mostra que esses metabólitos podem possuir papéis importantes nas vias de termotolerância, fundamentais para a sobrevivência do fungo no organismo hospedeiro.

Ainda a respeito de genes e *clusters* genéticos relacionados às vias de produção de policetídeos detectados na análise de RNAseq, os genes *tpcA* (Afu4g14580 - log 2fold increase 2,38) que codifica para uma O-metiltransferase e *tpcD* (Afu4g14550 - log 2fold increase 2,64) que codifica um coativador de transcrição, pertencem ao BSG de produção do metabólito tripacidina, outro metabólito secundário da classe dos policetídeos (BIGNELL et al., 2016). Esse *cluster* genético além de ser conservado em diversas espécies, como por exemplo *Pseudogymnoascus destructans*, espécie causadora da síndrome do nariz branco em morcegos, também é considerado como extremamente similar ao *cluster* de genes relacionados à produção de geodina, em *A. terreus* (BIGNELL et al., 2016; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; THROCKMORTON et al., 2016). Além de serem extremamente conservados, esses genes também já foram relatados como genes redundantes, ou seja, genes responsáveis pela síntese de outros compostos além daquele que foi originalmente assinalado (BIGNELL et al., 2016; THROCKMORTON et al., 2016).

Portanto, pode-se dizer que *A. fumigatus* possui um arsenal de genes de diferentes categorias que podem atuar para a formação diversos compostos através de vias metabólicas alternativas e interligadas. Já é sabido que além de serem responsáveis pela síntese do policetídeo tripacidina, os genes *nscB*, *nscE*, *nscC*, *nscR*, *tpcA* e *tpcD* também estão relacionados com a produção de outras classes de MSs, tais como as endocrocinas, a neosartoricina A e fumiciclina A, todos pertencentes à classe dos policetídeos, também já relacionados com as vias de produção de melanina e o metabolismo de regulação de íons ferro (BIGNELL et al., 2016; FUJII et al., 2004; MANFIOLLI et al., 2017; NIERMAN et al., 2005; THROCKMORTON et al., 2016). De forma geral a indução da expressão desses MSs é de extrema importância para o sucesso de *A. fumigatus* como um organismo patógeno oportunista, visto que esse arsenal de moléculas e MSs variados possui diversas funções, como proteção contra a luz ultravioleta (UV), termotolerância, inativação de processos relacionados à fagocitose por macrófagos, recrutamento de neutrófilos e competição com outros microrganismos presentes no epitélio pulmonar. (BIGNELL et al., 2016; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; MATTERN et al., 2015; NIERMAN et al., 2005; THROCKMORTON et al., 2016).

Ainda sobre os genes induzidos a 37°C em *A. fumigatus*, pode-se destacar também os genes *tpsD* (Afu5g14300), *hppD* (Afu2g04200), *atfB* (Afu5g12960) e *sebA* (Afu4g09080). Estudos revelaram que o gene *tpsD* (log 2 fold increase 2,77), codifica uma trealose-6-fosfato sintase putativa que participa do processo de biossíntese de trealose, um dissacarídeo importante para evitar dessecação de organismos e relacionado ao aumento da capacidade de retenção de água dentro as células (AL-BADER et al., 2010; KELLER et al., 2011; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; MÜLLER et al., 2012; NIERMAN et al., 2005). Os dados levantados pelo RNAseq sugerem que em uma situação de estresse térmico, a produção de compostos contra a dessecação, como a trealose, seja aumentada.

Quanto ao gene *hppD* (log 2fold increase 2,67), sabe-se que este codifica a 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, uma enzima responsável por atuar nas vias de produção da piomelanina e da DHN melanina. DHN melanina e pielomelanina são pigmentos encontrados nos conídios assexuais de *A. fumigatus*, e são responsáveis pela proteção contra EROs, compostos produzidos dentro dos fagolisossomos e responsáveis por causar danos e morte de células e esporos fúngicos após serem fagocitadas pelos macrófagos do sistema imune (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019). Também é sabido que esses compostos ajudam na proteção contra temperaturas extremas, exposição à luz UV, metais pesados e agentes antifúngicos. (KELLER et al., 2011; NIERMAN et al., 2005). O fato de *hppD* ser um dos genes induzidos no RNAseq realizado em nosso trabalho sugere que as vias de produção da piomelanina e DHN melanina se tornam mais ativas, aumentando os níveis de produção dessas moléculas como forma de resposta ao estresse térmico.

O gene *atfB* (log 2fold increase 1,82) também foi unicamente induzido quando *A. fumigatus* foi crescido a 37°C. *atfB* é um gene responsável por codificar um fator de transcrição de zíper de leucina básico (β -ZIP). Esse gene pertence a uma família de fatores de transcrição que contém também outros três fatores de transcrição nomeados AtfA, AtfC e AtfD, dos quais já se sabe que $\Delta atfA$ e $\Delta atfB$ possuem virulência menor que cepas selvagens (PEREIRA SILVA et al., 2017; SILVA; HORTA; GOLDMAN, 2021). Diversos estudos já relataram a importância desses fatores de transcrição β -ZIP, bem como a

capacidade de *AtfA-D* de formarem dímeros através de todas as combinações possíveis entre os quatro fatores de transcrição. Já se sabe que essa família de fatores de transcrição β -ZIP é importante devido suas diversas possíveis interações entre si, e com outras proteínas, como as extremamente conservadas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), com homólogos em diversos outros microrganismos.

Como se sabe, a exposição das células fúngicas a diferentes condições de estresse leva à ativação da via das MAPKs, proteínas envolvidas na manutenção e modulação da resposta adaptativa, resultando em maior resistência e garantindo a sobrevivência de *A. fumigatus*. A sinalização MAPKs resultada na alteração da expressão de genes que regulam diversos processos celulares, sendo um deles, o das vias de integridade da parede celular (CWIc), respostas a feromônios, crescimento filamentosos, biossíntese de componentes da parede celular, estabelecimento da virulência e mediação de resistência a drogas. As principais MAPKs relacionadas a esses processos até hoje estudadas são MpkA, MpkC e SakA (DE CASTRO et al., 2014; MÜLLER et al., 2012; PEREIRA SILVA et al., 2017; SILVA; HORTA; GOLDMAN, 2021). Portanto, pode-se dizer que a indução do gene *atfB* em *A. fumigatus* a 37°C pode indicar que esse fator de transcrição pode ser importante na regulação das vias envolvidas na resposta ao estresse térmico.

A respeito do gene *sebA* (log 2 fold increase 1,21), sabe-se que é um fator de transcrição homólogo do gene *seb1* da espécie *Trichoderma atroviride*, e que codifica uma proteína cujo domínio *zinc finger* C₂H₂ é 60% idêntica ao *zinc finger* da proteína Com2p de *Saccharomyces cerevisiae*. Esses fatores de transcrição estão relacionados com respostas a diferentes estresses, como acidificação do ambiente e estresse osmótico (DINAMARCO et al., 2012b). Em *A. fumigatus*, cepas mutantes Δ *sebA* possuem virulência em modelo animal de camundongos imunossuprimidos e submetidos à infecção fúngica (DINAMARCO et al., 2012b). Ainda, a caracterização de Δ *sebA* evidenciou que a cepa mutante é mais sensível ao estresse térmico, estresse oxidativo e escassez de nutrientes (DINAMARCO et al., 2012b). Como essas condições são frequentemente encontradas em organismos hospedeiros, a indução desse gene nesse experimento de RNAseq indica novamente que esse gene está

diretamente relacionado às vias de virulência e termotolerância de *A. fumigatus*.

Os genes *mep* (log 2 fold increase 1,52) e *mep20* (log 2 fold increase 1,75) codificam metaloproteases. Esse grupo de enzimas apresentam atividade proteolítica e geralmente são secretadas para facilitar a obtenção de nutrientes, como o carbono e o nitrogênio, em ambientes com pouca glicose disponível, bem como nitrogênio facilmente assimilável, como o epitélio pulmonar. O gene *mep1* codifica uma metaloprotease que atua em um mecanismo de defesa de *A. fumigatus* contra a imunidade humoral de hospedeiros humanos (HAGAG et al., 2012; SRIRANGANADANE et al., 2010). Essa protease encontra-se, principalmente, nos conídios fúngicos e é responsável por clivar proteínas ligantes ao manano e ficolinas. Isso sugere que *mep1* pode ser importante para a sobrevivência de *A. fumigatus* no epitélio pulmonar (LATGÉ; CHAMILOS, 2019; NIERMAN et al., 2005).

As descobertas realizadas por esse experimento de RNAseq permitem dizer que os genes detectados podem estar envolvidos na resposta à regulação térmica em *A. fumigatus*, quando comparado com outras espécies filogeneticamente próximas, porém pouco virulentas, como é o caso de *A. fischeri* e *A. oerlinghausenensis*. Esses resultados apontam, portanto, os principais genes cuja indução pode ser responsável pela maior capacidade de termotolerância, e que possivelmente estão relacionados com a maior virulência observada em *A. fumigatus* quando comparada com outras espécies filogeneticamente próximas da seção *Fumigati*.

Esses genes ainda não estudados, ou pouco estudados nesta espécie, bem como uma melhor caracterização desse grupo de genes pouco explorado, pode levar a identificação de alvos centrais dos processos envolvidos com a termotolerância, e conseqüentemente, de fatores relacionados à maior virulência e patogenicidade da *A. fumigatus* sendo importantes para coordenar o processo de adaptação à mudança de temperatura de 30°C para 37°C, nessa espécie. Portanto, o presente estudo traz à luz pela primeira vez possíveis genes alvo de estudos futuros que busquem melhores descrições dos mecanismos genéticos e biomoleculares envolvidos nas adaptações a 37°C, e conseqüentemente, na maior virulência observada em *A. fumigatus*.

Ainda a respeito dos 259 genes não ainda caracterizados que foram induzidos na análise de sequenciamento de RNA, muitos codificam proteínas com função deduzida a partir de identidade de sequência de aminoácidos, o que os torna possíveis candidatos a genes, proteínas e fatores de transcrição envolvidos nas vias de regulação do metabolismo de *A. fumigatus*. Esses genes podem estar envolvidos em respostas ao estresse térmico, produção de componentes importantes para sobrevivência sob estresse térmico, como por exemplo, MSs, matriz extracelular, biofilme, componentes da parede e membrana celular, aumentando assim, sua capacidade de causar danos e escapar das defesas de organismos hospedeiros, como já relatado em estudos passados (ABAD et al., 2010; BIGNELL et al., 2016; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; NIERMAN et al., 2005; PEREZ-CUESTA et al., 2021).

Buscando uma melhor categorização das possíveis funções exercidas pelos produtos dos genes aqui identificados como importantes para a resposta ao estresse térmico, os dados foram analisados através da plataforma *FungiFun*, utilizando-se o *FunCat* como sistema de caracterização de ontologia genética e análise de enriquecimento dos dados. Os dados de categorização dos 289 genes *up* regulados no RNAseq estão ilustradas na Tabela 3.

Categoria	Nº de genes encontrados
Aparatos de transporte celular	29
Destinação proteica	13
Biogênese de componentes celulares	12
Ligação proteica	11
Transporte de lipídeos e ácidos graxos	10
Modificação proteica	7
Síntese proteica	1

Tabela 3: A tabela mostra todas as sete categorias de genes mais frequentemente encontradas na lista de genes *up* regulados em *A. fumigatus* a 37°C. Foram encontradas 7 categorias de genes entre o grupo de genes de maior expressão. Os genes detectados como mais expressos foram categorizados via *FunCat*.

Quando os resultados obtidos são comparados com dados em estudos anteriores que também investigaram adaptações relacionadas à termotolerância em *A. fumigatus* (FABRI et al., 2021) e *Cryptococcus neoformans* (YANG et al., 2017), foi possível notar uma série de aspectos

importantes. A categoria predominante dentre os genes de maior expressão reúne genes que importantes para o transporte celular, com um total de 29 genes classificados dentro dessa categoria. Uma categoria semelhante de genes nomeada “tráfego e secreção intracelular” também foi apontada como importante em estudos prévios com *C. neoformans*, onde análises de ontologia genética revelaram 69, de um total de 313 genes dessa categoria como mais expressos nessa espécie, após choque térmico (YANG et al., 2017). Esses resultados apontam que, como resposta a estresse térmico o aparato genético é mobilizado para aumentar a produção de transcritos relacionados ao transporte de componentes celulares, seja intracelularmente (de uma organela para outra), como em processos envolvidos na secreção de componentes.

Também se destacaram 13 genes relacionados com a destinação proteica, 12 genes relacionados com as vias de biogênese de componentes celulares, 11 genes relacionados a ligações proteicas, 7 relacionados à modificação proteica e apenas 1 gene reconhecido por atuar na síntese proteica, o que de maneira geral, aponta para uma indução de vias de biossíntese de proteínas que são componentes celulares, bem como seu direcionamento para locais específicos das células fúngicas. Também houve 10 genes relacionados com o transporte de lipídeos e ácidos graxos, o que pode estar relacionado com a síntese de compostos da membrana celular.

Após uma análise dos genes classificados na tabela 3, percebe-se que ainda há um número relativamente pequeno de genes que puderam ser classificados de acordo com os bancos de dados disponíveis atualmente, quando comparado com o total de genes detectados como induzidos pelo desenho experimental do RNAseq realizado no presente estudo (289), indicando que, de fato, ainda existe muito para ser descoberto a respeito dos genes envolvidos nas regulações metabólicas responsáveis pelas adaptações de *A. fumigatus* ao estresse térmico. Em resumo os dados aqui obtidos indicam um aumento nas vias de biossíntese e transporte de componentes e/ou produtos celulares, principalmente relacionados às proteínas e lipídeos, durante a resposta ao estresse térmico e a germinação dos esporos em hifas, em um ambiente com temperaturas mais elevadas.

A análise do RNAseq também identificou um total de 992 genes menos expressos em *A. fumigatus* a 37°C, em comparação com o tratamento a 30°C.

Desses transcritos sequenciados, 48 genes “*down-regulated*” em *A. fumigatus* não possuem ortólogos em nenhuma das duas outras espécies aqui testadas, *A. fischeri* e/ou *A. oerlinghausenensis*, como mostra a Figura 20.

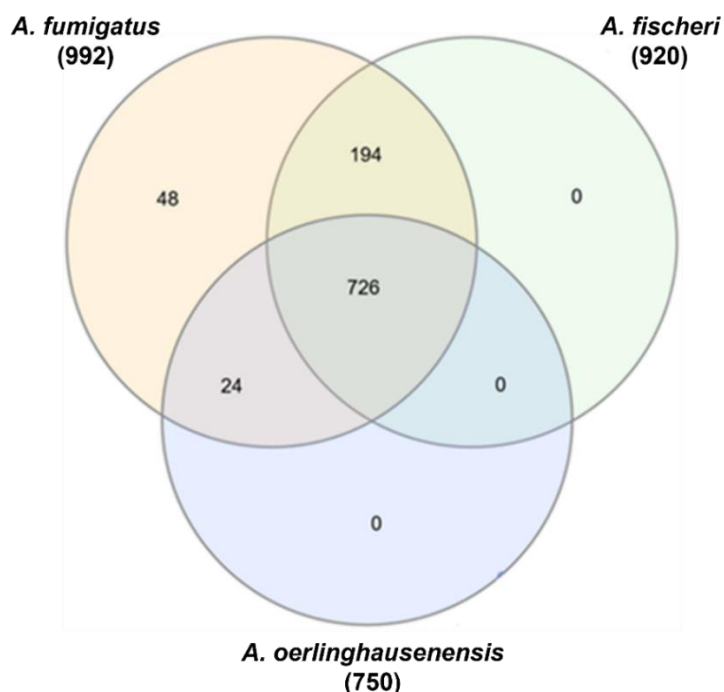


Figura 20: Perfil total de genes *down* Regulados em *A. fumigatus* a 37°C. Diagrama de Venn indicando o número total de genes reprimidos detectados em *A. fumigatus* a 37°C, e seu respectivo número de genes ortólogos encontrados nas outras duas espécies

Assim como foi feito para os genes “*up-regulated*”, a filtragem dos genes em busca dos genes reprimidos de forma significativa numa escala *log 2-fold change* com valor limite -1 permitiu a elaboração de uma lista final composta de 572 genes significativamente “*down-regulated*”, em *A. fumigatus* em comparação com as outras duas espécies não-virulentas e os tratamentos à 30°C. Após o levantamento bibliográfico, foi observado que neste conjunto de genes significativamente modulados em *A. fumigatus* puderam ser encontrados 73 genes previamente estudados e nomeados em trabalhos publicados a respeito desta espécie. Pode-se dizer, portanto, que esse trabalho encontrou 499 genes ainda não bem caracterizados por nenhum estudo prévio, indicando que todos esses 499 genes ainda não caracterizados, cuja expressão foi relatada como significativamente menor nesse desenho experimental, são candidatos a exercerem algum papel importante na regulação metabólica em processos envolvidos com a termotolerância da espécie *A. fumigatus*, sendo

também possíveis candidatos a genes, cuja regulação é fundamental para maior termotolerância e virulência observada na espécie *A. fumigatus*. Também é válido ressaltar que os outros 73 genes descobertos como reprimidos nesse experimento, e que já foram mais bem descritos na literatura, não necessariamente já foram relatados como envolvidos em processos de termotolerância e/ou fundamentais para a virulência, sendo também alvos de grande interesse nesse estudo. Os dados descritos estão expressos na tabela 4 e figura 21.

Genes induzidos	Quantidade
Total sequenciados	992
<i>Log 2-fold change</i>	572
Não caracterizados	499
Caracterizados na literatura	73

Tabela 4: Número de genes reprimidos detectados como diferencialmente expressos por *A. fumigatus* a 37°C.

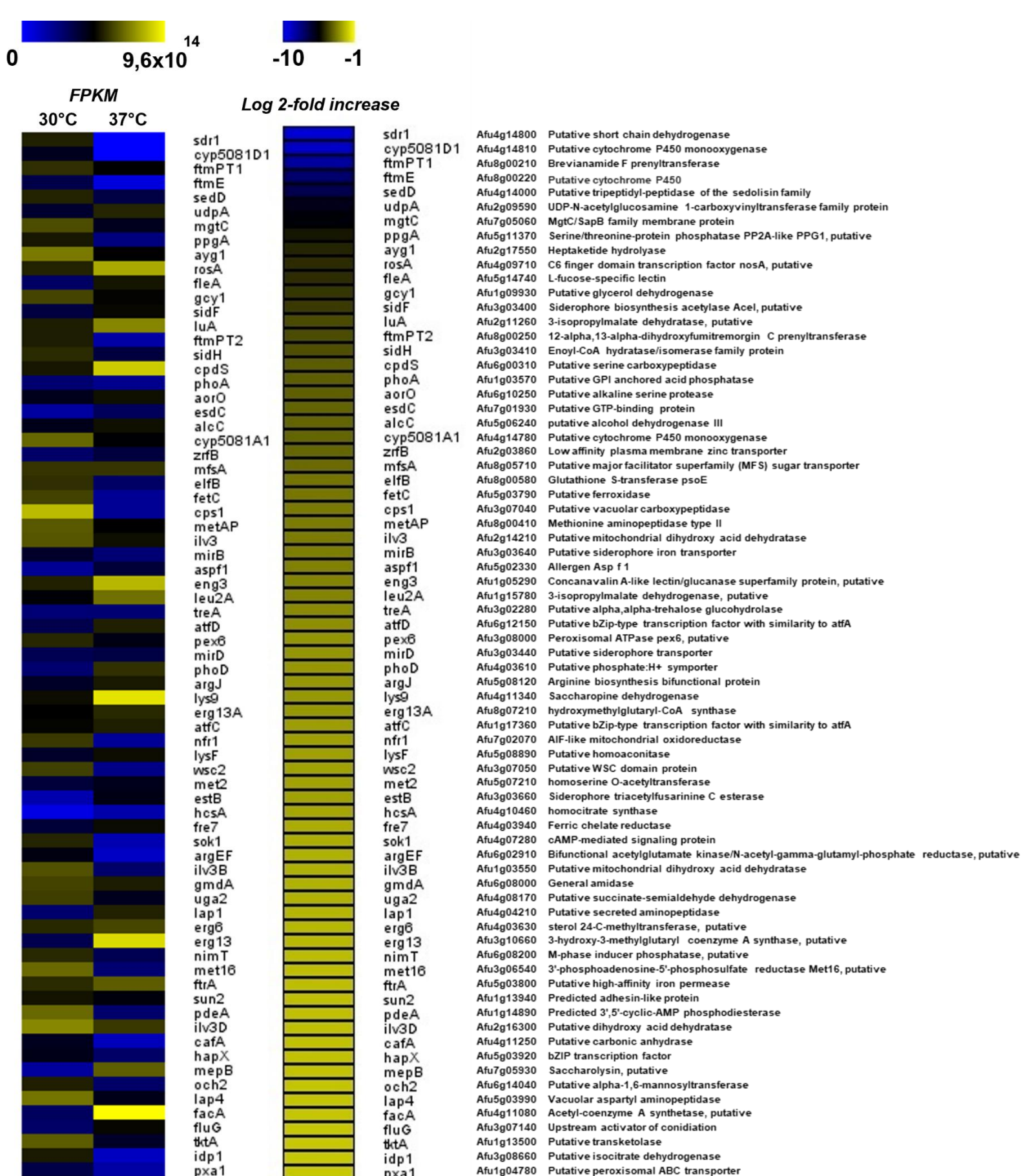


Figura 21: Comparação dos principais genes já descritos na literatura disponível, e detectados como reprimidos unicamente em *A. fumigatus* a 37°C pelas análises computacionais do RNAseq (log 2-fold increase ≤ -1). Heatmap gerado a partir dos dados de *fpkm* produzidos pela análise de RNAseq, comparando os níveis de expressão de cada gene a 30°C e 37°C.

A Figura 21 mostra o arranjo em heatmap, de acordo com os níveis de expressão dos 73 genes já caracterizados e identificados como reprimidos na análise transcriptômica comparativa entre a condição 30°C versus a condição 37°C. Dentre esses genes, alguns serão destacados devido sua já mencionada relevância em processos envolvidos com a regulação a estresse térmico e virulência em estudos passados. Dentre esses genes, foram selecionados para serem aqui discutidos os genes *sdr1* (Afu4g14800), *ftmPT1* (Afu8g00210), *ftmPT2* (Afu8g00250), *sedD* (Afu4g14000), *rosA* (Afu4g09710), *sidF* (Afu3g03400), *sidH* (Afu3g03410), *zrfB* (Afu2g03860), *mfsA* (Afu8g05710), *treA* (Afu3g02280), *atfD* (Afu6g12150), *atfC* (Afu1g17360), *mepB* (Afu7g05930), *hapX* (Afu5g03920) e *facA* (Afu4g11080).

Dentre os genes já caracterizados por estudos passados, o gene *sdr1* foi o gene com a maior repressão observada em toda a análise de genes já caracterizados (\log_2 fold change -9,24), o que foi constatado com certa surpresa, visto que esse gene já foi evidenciado como um gene importante e induzido em análises transcriptômicas anteriores que investigaram genes importantes para o processo de estabelecimento da infecção por *A. fumigatus* em modelo quimioterápico de infecção de camundongos (BIGNELL et al., 2016). O gene *sdr1* codifica uma proteína desidrogenase putativa de cadeia curta, responsável por atuar na síntese de um composto chamado protostadienol, um precursor importante para a formação do metabólito secundário conhecido como ácido helvólico, um metabólito que, assim como a tripacidina, possui atividade antiprotozoária e antibacteriana, sendo importante para a competição entre microrganismos colonizadores do epitélio pulmonar. Além de ser um potente antimicrobiano, o ácido helvólico, assim como a gliotoxina e a fumagilina, possui ação anticiliatória, inibindo a ação dos cílios presentes nas células do epitélio pulmonar, facilitando o processo de colonização do hospedeiro. Além de ser produzido por fungos potencialmente patógenos humanos, fungos patógenos de plantas e insetos também produzem ácido helvólico (BIGNELL et al., 2016; LODEIRO et al., 2009). Devido às descobertas aqui mencionadas a respeito do gene *sdr1*, supõe-se que, esse gene seja reprimido pela ação do calor, apesar de ser extremamente importante para o estabelecimento dos processos de infecção. Esses resultados corroboram a ideia de que outros sinais importantes são gerados

durante o processo de colonização, como por exemplo, as interações com outros microrganismos e as células do sistema imune presentes no tecido epitelial, fazendo com que esse gene seja mais expresso durante o processo de colonização de um hospedeiro, mesmo que os estímulos provenientes do estresse térmico sejam responsáveis por ativar vias repressoras da expressão do gene *sdr1*.

A respeito dos genes *ftmPT1* (log 2 fold change -8,19) e *ftmPT2* (log 2 fold change -3,45), sabe-se que são responsáveis por codificar uma brevinamida-F-preniltransferase e uma 12- α ,13- α -dihidroxifumitremorgina-C-preniltransferase respectivamente, e que essas enzimas estão envolvidas na síntese de compostos precursores necessários para a via de síntese do metabólito secundário conhecido como fumitremorgina B, composto com propriedades tóxicas e antimicrobianas que auxilia a sobrevivência do fungo (GRUNDMANN et al., 2008; MAHMOODI; TANNER, 2013). Ambos esses genes, assim como o gene *sdr1*, já foram indicados como importantes nos processos de estabelecimento da infecção de *A. fumigatus* (BIGNELL et al., 2016). Os resultados do presente RNAseq indicam novamente que alguns componentes responsáveis pela produção do arsenal de MSs presente na espécie *A. fumigatus* são reprimidos pela ação do estresse térmico, apesar de serem muito importantes no processo de infecção, indicando novamente que outros sinais provenientes do ambiente são responsáveis por contornar a repressão desses genes causada pela ação do estresse térmico, revelando portanto, uma complexa e finamente ajustada rede de receptores, cascatas de sinalização e proteínas efetoras responsáveis pela maior virulência e termotolerância apresentada por *A. fumigatus*.

Responsável por codificar uma tripeptidil-peptidase putativa da família das sedolisinas, o gene *sedD* (log 2 fold change -6,55) é extremamente importante para a obtenção de nutrientes em ambientes ácidos e onde a proteínas são a única fonte de energia presente (SRIRANGANADANE et al., 2010). Curiosamente, essa protease também parece ter sua expressão inibida pelo estresse térmico em *A. fumigatus*. Já a proteína *rosA* (log 2 fold change -4,10) é responsável por codificar um importante fator de transcrição de domínio dedo de zinco (II) 2Cys6, homólogo putativo e responsável por inibir as ações do fator de transcrição *nosA* em *A. nidulans* (FEDOROVA et al., 2008). Sabe-

se que esse fator de transcrição possui um importante papel como inibidor das vias de desenvolvimento sexual em *A. nidulans*, e, portanto, a sua inibição a 37°C pode ser responsável pela indução de processos de reprodução sexual desencadeados por estresse térmico, favorecendo a troca de material genético entre diferentes células, possivelmente aumentando as chances de sobrevivência de *A. fumigatus* em ambientes adversos (FEDOROVA et al., 2008; LIU et al., 2010).

Genes também “*down-regulated*” no presente estudo, *sidF* (log 2 fold change -3,82) e *sidH* (log 2 fold change -3,39) são responsáveis por codificar uma hidroxiornitina transacilase e uma mevalonil-CoA hidratase, respectivamente. Essas enzimas são extremamente importantes para as vias de biossíntese dos sideróforos extracelulares, fusarinina C e triacetilfurasrinina C (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021). A produção de sideróforos extracelulares é de suma importância para a sobrevivência de *A. fumigatus* em uma situação de colonização de epitélio pulmonar, visto que esses MSs são utilizados para a obtenção de íons ferro, os quais são menos solúveis e, portanto, menos disponíveis em ambientes neutros e alcalinos, como o epitélio pulmonar.

Curiosamente, esses genes parecem ser reprimidos em situações de estresse térmico, mesmo com a já comprovada importância dos mesmos genes no desenvolvimento de uma patologia como a aspergilose invasiva, onde mutantes $\Delta sidF$ e $\Delta sidH$ apresentaram índices de virulência reduzidos quando comparados à cepa selvagem. Esses resultados novamente sugerem que o estresse térmico não é o único fator determinante para a produção dos diversos mecanismos efetores da maior patogenicidade observada em *A. fumigatus*, reforçando que apesar da repressão desses genes em tratamentos com estresse térmico, o ajuste das diversas variáveis encontradas durante o processo de infecção provavelmente faz com que a repressão desses genes pela ação do calor seja contornada, fazendo com que esses importantes fatores de transcrição para a virulência desse fungo sejam expressos em uma situação de infecção real.

Com relação ao gene *hapX* (log 2 fold change -1,16), diversos estudos já descreveram uma série de interações desse fator de transcrição da família β -ZIP, que possui um papel central na homeostase de íons ferro, e em diversos

outros mecanismos celulares fundamentais para a sobrevivência do fungo, como a regulação das vias de integridade da parede celular (CWI) comandadas pelas MAPKs (HAAS, 2012; JAIN et al., 2011; PEREZ-CUESTA et al., 2021; SCHRETTL et al., 2008; SCHRETTL; HAAS, 2011). Cepas mutantes $\Delta hapX$ apresentam diminuição na quantidade de conídios assexuais produzidos e diminuição na produção de sideróforos, e sabe-se que *hapX* é um fator de transcrição induzido por *srbA* e que possui função antagônica ao fator de transcrição *sreA*, onde a presença de um é responsável pela inibição do outro, sendo *hapX* o responsável pela indução das vias de aquisição de ferro e a repressão das vias de consumo de ferro (HAAS, 2012; JAIN et al., 2011; PEREZ-CUESTA et al., 2021; SCHRETTL et al., 2008; SCHRETTL; HAAS, 2011). Curiosamente, a análise de RNAseq detectou o fator de transcrição como reprimido, porém não foi detectado um aumento nos níveis de expressão de *sreA* ou *srbA*, indicando que as vias de termotolerância podem envolver outros reguladores da expressão de *hapX*, revelando uma nova função para esse fator de transcrição outrora não relacionado aos processos de termotolerância.

O gene *zrfB* (\log_2 fold change -2,95) é responsável por codificar uma proteína transportadora de zinco com baixa afinidade à membrana plasmática, e mostrou-se como uma proteína reprimida durante o processo de adaptação de 30°C para 37°C em *A. fumigatus*. Estudos revelaram que a expressão dessa proteína está diretamente relacionada com a obtenção de zinco em ambientes ácidos e com limitação de zinco, sendo que *zrfB* não é importante para a obtenção de zinco em condições alcalinas, como as encontradas no pulmão de hospedeiros (AMICH et al., 2010; MORENO et al., 2007; PEREZ-CUESTA et al., 2021). As análises de RNAseq do presente estudo revelaram que essa proteína também é regulada e, portanto, menos expressa em condições de adaptação ao estresse térmico em *A. fumigatus*, mostrando uma sinergia entre os sinais gerados pelas vias de resposta ao estresse térmico e as vias de resposta ao estresse promovido por ambientes alcalinos.

A proteína *mfsA* (\log_2 fold change -2,86) codifica uma proteína reconhecida como uma das principais facilitadoras de transporte (MFS), que atua de maneira semelhante que os transportadores de efluxo multidrogas *flu1* de *Candida albicans*, via também relacionada com maior resistência a azóis em

A. fumigatus, e com a produção de ácido itacônico em *A. niger* (CRESPO-SEMPERE; MARTÍNEZ-CULEBRAS; GONZÁLEZ-CANDELAS, 2014; FERREIRA et al., 2006; VAN DER STRAAT et al., 2014).

Apesar de ser considerado um transportador importante para maior capacidade de adaptação de *A. fumigatus* a condições desfavoráveis, esse transportador é reprimido em regulações gênicas envolvidas com a termotolerância, assim como outros genes aqui relatados. O gene *treA* (\log_2 fold change -2,24) é responsável por codificar uma proteína putativa α -trealose glucohidrolase, extremamente importante nos processos de catabolismo e degradação de trealose e formação e maturação de conídios assexuais (NI; YU, 2007; NIERMAN et al., 2005; SUGUI et al., 2008). A observação da repressão nesse gene condiz com observações de estudos anteriores, visto que a presença da trealose é fundamental para a manutenção da integridade do organismo frente ao estresse térmico, e conseqüentemente o estresse osmótico (perda de água) gerado pelo aumento de temperatura. Portanto a repressão desse gene implica na redução da degradação da trealose e a formação de conídios, favorecendo a sobrevivência de *A. fumigatus* em ambientes com temperaturas mais altas e favorecendo sua capacidade patogênica (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; NI; YU, 2007; NIERMAN et al., 2005; SUGUI et al., 2008).

Devem ser destacados também os genes *atfC* (\log_2 fold change -1,87) e *atfD* (\log_2 fold change -2,16), os quais codificam fatores de transcrição semelhantes ao gene *atfB* descrito acima, juntamente com a lista de genes induzidos por esse mesmo RNAseq. Como já discutido no item anterior, os genes da família *atfA-D* codificam fatores de transcrição com zíper de leucina básico (b-ZIP), e interagem em combinações diversas para regular as vias de sinalização das MAPKs, proteínas centrais e fundamentais na regulação de diversos processos celulares, como as vias de integridade e biossíntese da parede celular (CWI) (DE CASTRO et al., 2014; PEREIRA SILVA et al., 2017; SILVA; HORTA; GOLDMAN, 2021). A regulação dos fatores de transcrição AtfC e AtfD frente ao tratamento de *A. fumigatus* à 37°C revela que o fator de transcrição induzido, AtfB, e conseqüentemente os seus principais alvos e parceiros de interação, são os principais responsáveis pelas regulações metabólicas de *A. fumigatus* relacionadas à termotolerância. O gene *mepB* (\log

2 fold change -1,15) codifica uma metaloprotease intracelular, enquanto os genes induzidos nesse mesmo experimento de RNAseq, *mep* e *mep20*, codificam metaloproteases que são em seguida secretadas. Esse resultado indica que as respostas metabólicas de *A. fumigatus* em relação à termotolerância envolvem a secreção de proteínas para a obtenção de nutrientes do meio externo, diminuindo a degradação proteica intracelular, o que provavelmente também está relacionado com o processo de germinação de esporos em hifas e desenvolvimento celular (ABAD et al., 2010; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; NIERMAN et al., 2005).

O gene *facA* (log 2 fold change -1,07) foi identificado como codificador de uma proteína acetil-CoA sintetase, a qual já foi relacionada com o metabolismo de acetato (GROSSE et al., 2008), sendo também relacionada em outro estudo com a biossíntese de lipídios, após choque térmico, onde seus níveis de transcrição foram reprimidos (semelhantemente ao atual experimento), induzindo o metabolismo de lipídios em *A. fumigatus* (ALBRECHT et al., 2010). Pode-se dizer, portanto, que a lista de genes unicamente reprimidos em *A. fumigatus* a 37°C representa genes que possivelmente não possuem um papel importante das principais vias atuantes nos processos celulares envolvidos em adaptações ao calor, ou ainda, podem representar genes repressores dos genes envolvidos nesses processos.

Do conjunto de 572 genes que apresentaram log₂FC mínima de -1, um total 499 não caracterizados ou com função deduzida a partir de análises computacionais de homologia genética são reprimidos especificamente em *A. fumigatus* a 37°C. Esse dado sugere que esse conjunto de genes pode conter alvos de interesse para futuros estudos que busquem desvendar os processos envolvidos nas vias de termotolerância. Portanto, assim como relatado para os genes induzidos, o presente estudo traz à luz pela primeira vez genes ainda não caracterizados, que podem ser alvos de estudos futuros que busquem um melhor entendimento dos mecanismos genéticos e biomoleculares envolvidos nas adaptações de *A. fumigatus* a 37°C, e conseqüentemente, em sua maior virulência, como por exemplo, MSs, biofilme, parede celular e membrana celular (ABAD et al., 2010; BIGNELL et al., 2016; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; NIERMAN et al., 2005; PEREZ-CUESTA et al., 2021).

Assim como foi feito para os genes induzidos, a execução da análise de categorização de genes através da plataforma *FungiFun* identificou as principais categorias presentes na lista dos 572 genes “*down-regulated*” no RNAseq as quais são ilustradas na Tabela 5.

Categoria	N° de genes encontrados
Metabolismo (geral)	274
Proteínas com função de ligação	111
Metabolismo secundário	104
Metabolismo de carboidratos	97
Metabolismo de aminoácidos	83
Metabolismo de lipídeos e ácidos graxos	65
Complexos de ligação a cofatores/cosubstratos/vitaminas	49
Metabolismo de nitrogênio/enxofre/selênio	34
Metabolismo de Cisteína	33
Biogênese de componentes celulares	33

Tabela 5: A tabela mostra todas as dez principais categorias de genes mais frequentemente encontradas na lista de genes “*down-regulated*” em *A. fumigatus* a 37°C. Foram encontradas mais de 20 categorias de genes entre o grupo de genes de maior expressão, das quais apenas as 10 categorias foram ilustradas nessa tabela. Os genes detectados como menos expressos foram categorizados via FunCat.

Sobre os dados obtidos através das análises de enriquecimento e caracterização de ontologia dos genes “*down-regulated*” pelo sistema *FungiCat*. A partir dessa análise, puderam ser evidenciados 274 genes reprimidos relacionados com processos metabólicos em geral, contando com genes relacionados ao metabolismo de classes específicas de moléculas, como, por exemplo, 97 genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, 83 genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos, 65 genes reprimidos relacionados ao metabolismo de lipídeos e ácidos graxos. Dentre os genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos, destacaram-se também 33 genes relacionados principalmente ao metabolismo da cisteína. Também se destacaram 34 genes do metabolismo de compostos ricos em nitrogênio, enxofre e selênio, assim como 49 genes responsáveis pela produção de complexos proteicos que se ligam a cofatores, co-substratos e vitaminas, o que

indica que estão ocorrendo mudanças nessas rotas, indicando portanto que quando *A. fumigatus* é confrontado com condições de temperaturas mais elevadas, há um direcionamento de seu metabolismo diminuindo a expressão de genes relacionados com todas as rotas mencionadas aqui como reprimidas, mantendo-se o foco nos genes que devem ser induzidos para combater os efeitos adversos causados pelo estresse térmico.

Curiosamente, a categoria de genes responsáveis pela biogênese de componentes celulares foi apontada como um conjunto importante de genes, tanto entre o grupo de genes “*up-regulated*” como no conjunto de genes “*down-regulated*”, sugerindo assim que essa é uma via bastante dinâmica, com genes responsáveis por funções diversas em relação à termotolerância, sendo possível também que essa categoria de genes esteja relacionada com a germinação dos esporos em hifas em condições de aumento de temperatura.

4.4. Validação dos resultados do RNAseq

A análise transcriptômica indicou que sob condições de estresse térmico diversos genes relacionados ao metabolismo de maneira geral são induzidos. Aparentemente, genes pertencentes a vias de obtenção de nutrientes (como ferro e zinco, por exemplo), bem como genes relacionados à síntese e transporte de compostos e estruturas celulares são induzidos. Dentre os genes detectados como induzidos na análise transcriptômica, 5 foram escolhidos para validação dos dados de RNAseq via PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Assim, os genes AFUB_053180, AFUB_075600, AFUB_077810, AFUB_077820 e AFUB_081810 (*log₂ fold change* iguais a 1,32, 2,36, 3,57, 2,16 e 2,83, respectivamente) e tiveram a expressão validada por RT-qPCR.

Esses genes codificam proteínas com domínio conservado e semelhante aos codificados pelo gene RTA1 (*Resistance to 7-aminocholesterol*), o qual foi caracterizado como uma proteína de membrana e parede celular, fundamental para as vias de biossíntese de ergosterol, transporte e exportação de lipídeos celulares e tido como uma importante classe de genes, responsável pelo manejo de condições de estresse, e cuja super-expressão parece conferir resistência aos inibidores da síntese de ergosterol, que é o principal mecanismo de ação dos antifúngicos da classe dos azóis (SRIVASTAVA et al.,

2017). Esses processos são relacionados a vias de resistência a drogas antifúngicas em estudos com a espécie de fungos patogênicos, *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *A. fumigatus*, onde também foi levantada a hipótese de que esses genes poderiam ser importantes na remodelagem da membrana plasmática na transição de 20 a 37 °C. (HOKKEN et al., 2019; MANENTE; GHISLAIN, 2009; SRIVASTAVA et al., 2017).

Portanto, a partir das mesmas amostras de RNA utilizadas na análise do RNAseq, foram realizados ensaios de RT-qPCR para validação dos dados obtidos no RNAseq. A Figura 22 mostra resultados obtidos.

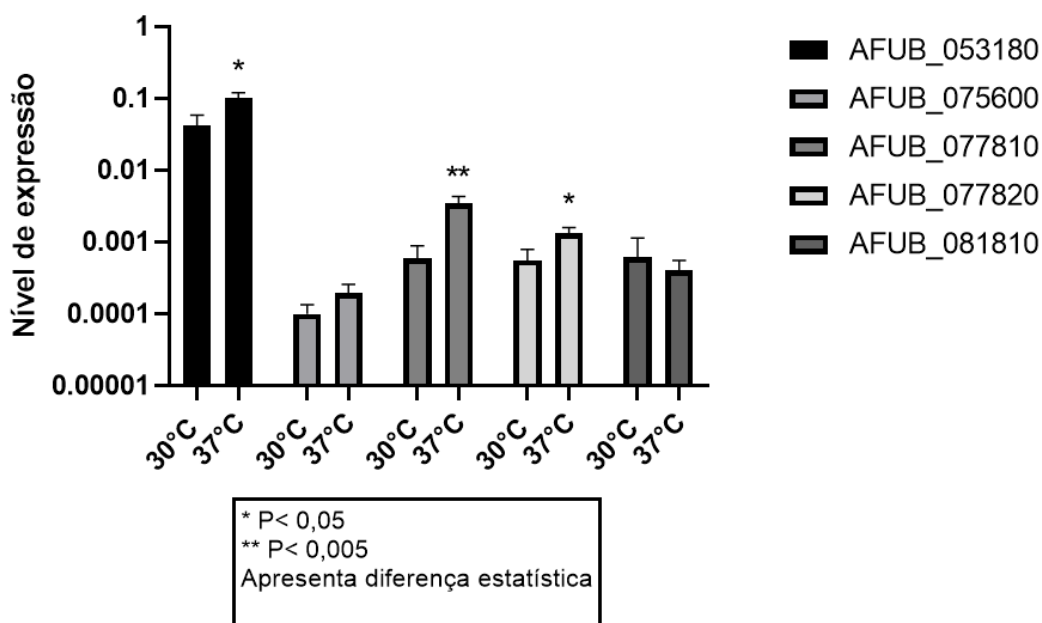


Figura 22: Validação via RT-qPCR dos genes com domínio RTA1 detectados como significativamente mais expressos nas análises do RNAseq. Histogramas contendo os dados analisados via múltiplos testes t.

De acordo com as análises de RT-qPCR apresentadas na Figura 22, apenas os genes AFUB_053180, AFUB_077810 e AFUB_077820 foram mais expressos à 37°C e foram, portanto, validados por essa abordagem. Esses resultados confirmam que há um provável envolvimento das proteínas com domínio semelhante aos das proteínas da família RTA1 com processos de termorregulação. Portanto, pode-se dizer que os genes com domínio RTA1 associados com as vias de biossíntese de ergosterol, transporte e exportação de lipídeos, além de serem grandes responsáveis pelo aparecimento de mecanismos de resistência a drogas, também podem estar associados com

mecanismos de resistência ao calor, não só em espécies leveduriformes, como *C. albicans* e *C. glabrata*, como também na espécie *A. fumigatus* (HOKKEN et al., 2019; MANENTE; GHISLAIN, 2009; SRIVASTAVA et al., 2017).

De acordo com a afirmação do parágrafo anterior, a transferência do crescimento fúngico de 30°C para 37°C sugere que possa haver uma remodelagem da membrana plasmática frente ao estresse térmico ao qual as cepas foram submetidas. Esse tipo de reação já foi previamente relatado, onde regulações transcriptômicas em *A. fumigatus* foram avaliadas após choque térmico, revelando que de fato há uma interconexão entre as perturbações na parede celular causadas pelo estresse térmico, e os mecanismos tradicionalmente relacionados às regulações de choque térmico (FABRI et al., 2021). Por fim, esses resultados sugerem que a capacidade de remodelagem das vias de biossíntese e integridade da parede celular observados em *A. fumigatus* podem estar relacionados com o maior sucesso apresentado por *A. fumigatus* ao infectar seres humanos imunocomprometidos, quando comparado com as outras espécies da seção *Fumigati* estudadas no trabalho aqui relatado.

Conforme apontado nas análises do RNAseq e confirmado via RT-qPCR, as vias de biossíntese de ergosterol e lipídios estão diretamente relacionadas com respostas ao estresse térmico. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores, como por exemplo os que investigaram as funções desempenhadas pelo fator de transcrição *SrbA* (*sterol regulatory element binding protein*), que assim como as proteínas com domínio RTA1, é responsável por regular as vias síntese de esteróis. Além disso, *SrbA* também é responsável pela ativação das vias de formação de sideróforos para obtenção de ferro, e é fundamental para o crescimento em condições de hipóxia, sendo mutantes $\Delta srbA$ incapazes de crescer em condições de hipóxia (KROLL et al., 2014; LATGÉ; CHAMILOS, 2019; PEREZ-CUESTA et al., 2021). Portanto, tanto o fator de transcrição *SrbA* como as proteínas com domínio RTA1 podem estar associadas com a maior virulência e termotolerância observadas em *A. fumigatus*, em comparação com as outras espécies aqui analisadas

5. CONCLUSÕES

O presente estudo se propôs a estudar diferentes espécies de *Aspergillus* com o intuito de assim revelar possíveis traços e características únicas de *A. fumigatus*, o principal patógeno humano pertencente a esse gênero, responsáveis por conferir maior virulência a essa espécie. Com os testes aqui realizados puderam ser realizadas muitas descobertas acerca da performance das quatro espécies, *A. fumigatus*, *A. oerlinghausenensis*, *A. fischeri* e *A. lentulus* nos mais variados contextos. Foi descoberto que, de maneira geral, *A. fumigatus* possui melhores mecanismos de adaptação a variadas situações, possuindo melhor desempenho que as outras espécies, de maneira geral, quando analisadas sob condições adversas, como meios de cultura semelhantes ao epitélio humano em composição, altas temperaturas, escassez de nutrientes e limitação à determinadas fontes de carbono ou nitrogênio para o metabolismo.

Além de terem o crescimento avaliado em diferentes temperaturas e sendo cultivados em diferentes fontes de nutrientes disponíveis, as quatro espécies de *Aspergillus* também foram analisadas quanto a parâmetros considerados importantes para o processo de colonização de um hospedeiro, como a formação de biofilme e crescimento na presença de drogas perturbadoras de integridade da parede celular, como CSP, CR e CFW. Os resultados das análises apontam para uma melhor capacidade de aderência das células e esporos de *A. fumigatus* aos substratos, também sendo observado um melhor desempenho de *A. fumigatus* quando enfrentando grandes concentrações de drogas perturbadoras da integridade da parede celular, de maneira geral.

As diferentes espécies de *Aspergillus* também foram testadas quanto às suas capacidades de crescerem em condições de hipóxia e escassez de ferro, condições frequentemente encontradas durante a invasão de um organismo hospedeiro humano. Os resultados indicaram que apesar de *A. fumigatus* possuir melhor desempenho que as outras três espécies testadas em condições de hipóxia, o que não foi observado em meios com escassez de

ferro, indicando que, provavelmente, as adaptações de *A. fumigatus* para crescimento em condições de hipóxia não estão presentes nas outras espécies testadas, ao contrário do que foi observado com relação às adaptações para crescimento em ambientes com escassez de ferro, indicando que a capacidade de crescer em condições de hipóxia pode ser um fator determinante para a maior virulência observada em *A. fumigatus*. Também foram feitos testes *in vivo* com as quatro cepas estudadas, confirmando a maior capacidade de *A. fumigatus* em causar doença a 37°C, tanto em modelos de *G. mellonella* como em modelos de camundongos quimioterápicos.

Após *A. fumigatus* ser confirmada como a espécie com maior versatilidade nutricional, maior capacidade em lidar com diferentes estresses, maior aderência de biofilme formado e maior capacidade patogênica, em comparação com as outras três espécies aqui utilizadas, foi feito um sequenciamento de RNA de *A. fumigatus* e as outras duas espécies relatadas como não virulentas, *A. oerlinghausenensis* e *A. fischeri*, buscando identificar genes unicamente mais ou menos expressos em *A. fumigatus*. Esses experimentos revelaram que a transição de temperatura de 30°C para 37°C é responsável, tanto por estimular, como por reprimir a transcrição de diversos genes relacionados com vias importantes no metabolismo fúngico. Dentre os genes com expressão induzida puderam ser identificados diversos fatores de transcrição responsáveis pela produção de MSs importantes para interações com o sistema imunológico do hospedeiro, genes envolvidos na produção e secreção de proteases e sideróforos responsáveis pela obtenção de nutrientes no ambiente, bem como outros fatores de transcrição responsáveis por atuar em mecanismos estruturais do metabolismo fúngico, principalmente aqueles envolvidos em vias da manutenção da integridade da parede celular. Análises de ontologia genética e categorização dos genes também revelaram a indução de genes relacionados com a síntese e o transporte de componentes celulares em *A. fumigatus*.

Com relação aos genes unicamente silenciados em *A. fumigatus* após a transição de 30°C para 37°C, foram detectados genes relacionados a funções metabólicas de maneira geral. Também pôde ser observado que um número maior de genes foi reprimido, quando comparado ao número de genes detectados como induzidos, indicando a repressão de genes também pode ser

muito importante para uma maior adaptabilidade às condições de estresse térmico, onde o fungo deve focar unicamente na produção de compostos essenciais para a sobrevivência em ambientes mais quentes. Também puderam ser detectados diversos genes de categorias semelhantes aos genes induzidos, o que indica que há um ajuste bastante complexo entre os diversos genes responsáveis pelas adaptações ao aumento de temperatura.

Tomadas em conjunto, essas descobertas apontam que *A. fumigatus* é uma espécie com mecanismos bastante eficientes para se adaptar rapidamente a diversas situações, como mudanças de temperatura, e de fontes de nutrientes disponíveis, presença de drogas antifúngicas e fungistáticas, situações frequentemente encontradas durante o processo de colonização de hospedeiros. As análises sugerem ainda que a espécie possui um arsenal único e exclusivo de genes responsáveis pela produção de MSs específicos e adaptações metabólicas que auxiliam a superar os desafios encontrados durante a invasão do organismo humano. Esse estudo também revelou muitos genes ainda não caracterizados que podem estar relacionados com adaptações a sobrevivência a 37°C, indicando que são genes alvo interessantes para investigações futuras buscando desvendar melhor os mecanismos unicamente presentes em *A. fumigatus*, sendo possivelmente os responsáveis por conferir a maior virulência e adaptabilidade observada nessa espécie.

REFERÊNCIAS

- ABAD, Ana et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 155–182, 2010. DOI: 10.1016/j.riam.2010.10.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140610000896>.
- ADNAN, Muhammad; ZHENG, Wenhui; ISLAM, Waqar; ARIF, Muhammad; ABUBAKAR, Yakubu Saddeeq; WANG, Zonghua; LU, Guodong. Carbon catabolite repression in filamentous Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–23, 2018. DOI: 10.3390/ijms19010048.
- AGARWAL, R.; CHAKRABARTI, A.; SHAH, A.; GUPTA, D.; MEIS, J. F.; GULERIA, R.; MOSS, R.; DENNING, D. W. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. **Clinical & Experimental Allergy**, [S. l.], v. 43, n. 8, p. 850–873, 2013. DOI: 10.1111/cea.12141. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cea.12141>.
- AIMANIANDA, Vishukumar et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. **Nature**, [S. l.], v. 460, n. 7259, p. 1117–1121, 2009. DOI: 10.1038/nature08264. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature08264>.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana et al. Treatment of Chronic Pulmonary Aspergillosis: Current Standards and Future Perspectives. **Respiration**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 159–170, 2018. a. DOI: 10.1159/000489474. Disponível em: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000489474>.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana et al. Treatment of Chronic Pulmonary Aspergillosis: Current Standards and Future Perspectives. **Respiration**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 159–170, 2018. b. DOI: 10.1159/000489474. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/489474>.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana; ALCAZAR-FUOLI, Laura; CUENCA-ESTRELLA, Manuel. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *aspergillus*. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 178, n. 5–6, p. 427–433, 2014. DOI: 10.1007/s11046-014-9775-z.

AL-BADER, Nadia et al. Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 78, n. 7, p. 3007–3018, 2010. DOI: 10.1128/IAI.00813-09.

ALBRECHT, Daniela; GUTHKE, Reinhard; BRAKHAGE, Axel A.; KNIEMEYER, Olaf. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-32.

ALEKSEEVA, Ludmila et al. Inducible expression of beta defensins by human respiratory epithelial cells exposed to *Aspergillus fumigatus* organisms. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 33, 2009. DOI: 10.1186/1471-2180-9-33. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-33>.

ALTWASSER, Robert; BALDIN, Clara; WEBER, Jakob; GUTHKE, Reinhard; KNIEMEYER, Olaf; BRAKHAGE, Axel A.; LINDE, Jörg; VALIANTE, Vito. Network Modeling Reveals Cross Talk of MAP Kinases during Adaptation to Caspofungin Stress in *Aspergillus fumigatus*. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. e0136932, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136932>.

AMICH, Jorge; VICENTEFRANQUEIRA, Rocío; LEAL, Fernando; CALERA, José Antonio. *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc homeostasis system encoded by the *zrfc* and *aspf2* genes. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 424–437, 2010. DOI: 10.1128/EC.00348-09.

AMICH, Jorge; VICENTEFRANQUEIRA, Rocío; MELLADO, Emilia; RUIZ-CARMUEGA, Ana; LEAL, Fernando; CALERA, José Antonio. The ZrfC alkaline zinc transporter is required for *Aspergillus fumigatus* virulence and its growth in the presence of the Zn/Mn-chelating protein calprotectin. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 548–564, 2014. DOI: 10.1111/cmi.12238. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cmi.12238>.

ANDREINI, Claudia; BERTINI, Ivano; CAVALLARO, Gabriele; HOLLIDAY, Gemma L.; THORNTON, Janet M. Metal ions in biological catalysis: From enzyme databases to general principles. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 1205–1218, 2008. DOI: 10.1007/s00775-008-0404-5.

BADER, Oliver; TÜNNERMANN, Jana; DUDAKOVA, Anna; TANGWATTANACHULEEPORN, Marut; WEIG, Michael; GROSS, Uwe. Environmental Isolates of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, [S. l.], v. 59, n. 7, p. 4356–4359, 2015. DOI: 10.1128/AAC.00100-15. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00100-15>.

BALAJEE, S. Arunmozhi et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 3138–3141, 2009. DOI: 10.1128/JCM.01070-09.

BALDIN, Clara; VALIANTE, Vito; KRÜGER, Thomas; SCHAFFERER, Lukas; HAAS, Hubertus; KNIEMEYER, Olaf; BRAKHAGE, Axel A. Comparative proteomics of a tor inducible *Aspergillus fumigatus* mutant reveals involvement of the Tor kinase in iron regulation. **Proteomics**, [S. l.], v. 15, n. 13, p. 2230–2243, 2015. DOI: 10.1002/pmic.201400584.

BASTOS, Rafael W.; ROSSATO, Luana; GOLDMAN, Gustavo H.; SANTOS, Daniel A. Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross-resistance to medical drugs and beyond. **PLOS Pathogens**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. e1010073, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010073>.

BASTOS, Rafael Wesley et al. Functional Characterization of Clinical Isolates of the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus nidulans*. **mSphere**, [S. l.], v. 5, n. 2, 2020. DOI: 10.1128/msphere.00153-20.

BASTOS, Rafael Wesley; AKIYAMA, Daniel; DOS REIS, Thaila Fernanda; COLABARDINI, Ana Cristina; LUPERINI, Rafael Sanchez; DE CASTRO, Patrícia Alves; BALDINI, Regina Lúcia; FILL, Taícia; GOLDMAN, Gustavo H. Secondary Metabolites Produced during *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. **mBio**, [S. l.], v. 13, n. 4, 2022. DOI: 10.1128/mbio.01850-22. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.01850-22>.

BEAUVAIS, Anne; FONTAINE, Thierry; AIMANIANDA, Vishukumar; LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus* Cell Wall and Biofilm. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 178, n. 5–6, p. 371–377, 2014. DOI: 10.1007/s11046-014-9766-0. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-014-9766-0>.

BELLANGER, Anne-Pauline; MILLON, Laurence; KHOUFACHE, Khaled; RIVOLLET, Danièle; BIÈCHE, Ivan; LAURENDEAU, Ingrid; VIDAUD, Michel; BOTTEREL, Françoise; BRETAGNE, Stéphane. *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory

mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. **Journal of Medical Microbiology**, England, v. 58, n. 2, p. 174–179, 2009. DOI: 10.1099/jmm.0.005488-0. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.005488-0>.

BERTUZZI, Margherita et al. The pH-Responsive PacC Transcription Factor of *Aspergillus fumigatus* Governs Epithelial Entry and Tissue Invasion during Pulmonary Aspergillosis. **PLoS Pathogens**, United States, v. 10, n. 10, p. e1004413, 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004413. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004413>.

BHABHRA, R.; ASKEW, David S. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 43, n. s1, p. 87–93, 2005. DOI: 10.1080/13693780400029486. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780400029486>.

BIGNELL, Elaine; CAIRNS, Timothy C.; THROCKMORTON, Kurt; NIERMAN, William C.; KELLER, Nancy P. Secondary metabolite arsenal of an opportunistic pathogenic fungus. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 371, n. 1709, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1098/rstb.2016.0023.

BIGNELL, Elaine; NEGRETE-URTASUN, Susana; CALCAGNO, Ana Maria; HAYNES, Ken; ARST, Herbert M.; ROGERS, Tom. The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 1072–1084, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04472.x.

BLATZER, Michael et al. SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 7, n. 12, 2011. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002374.

BOM, Vinícius Leite Pedro et al. The *Aspergillus fumigatus* sitA phosphatase homologue is important for adhesion, cell wall integrity, biofilm formation, and virulence. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 728–744, 2015. DOI: 10.1128/EC.00008-15.

BONGOMIN, Felix; GAGO, Sara; OLADELE, Rita; DENNING, David. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 57, 2017. DOI: 10.3390/jof3040057. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/57>.

BROWN, Alec; MEAD, Matthew E.; STEENWYK, Jacob L.; GOLDMAN, Gustavo H.; ROKAS, Antonis. Extensive Non-Coding Sequence Divergence Between the Major Human Pathogen *Aspergillus fumigatus* and its Relatives. **Frontiers in Fungal Biology**, [S. l.], v. 3, n. July, p. 1–13, 2022. DOI: 10.3389/ffunb.2022.802494.

BROWN, Neil A.; GOLDMAN, Gustavo H. The contribution of *Aspergillus fumigatus* stress responses to virulence and antifungal resistance. **Journal of Microbiology**, Korea (South), v. 54, n. 3, p. 243–253, 2016. DOI: 10.1007/s12275-016-5510-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12275-016-5510-4>.

BULTMAN, Katherine M.; KOWALSKI, Caitlin H.; CRAMER, Robert A. *Aspergillus fumigatus* virulence through the lens of transcription factors. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 24–38, 2017. DOI: 10.1093/mmy/myw120.

BUNNEY, John; WILLIAMSON, Shae; ATKIN, Dianne; JEANNERET, Maryn; COZZOLINO, Daniel; CHAPMAN, James; POWER, Aoife; CHANDRA, Shaneel. The Use of Electrochemical Biosensors in Food Analysis. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 183–195, 2017. DOI: 10.12944/CRNFSJ.5.3.02. Disponível em: <http://www.foodandnutritionjournal.org/volume5number3/the-use-of-electrochemical-biosensors-in-food-analysis/>.

BURNIE, James P.; CARTER, Tracey L.; HODGETTS, Samantha J.; MATTHEWS, Ruth C. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 53–88, 2006. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2005.00001.x.

CEGELSKI, Lynette. Bottom-up and top-down solid-state NMR approaches for bacterial biofilm matrix composition. **Journal of Magnetic Resonance**, [S. l.], v. 253, p. 91–97, 2015. DOI: 10.1016/j.jmr.2015.01.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.01.014>.

CHANG, Yun C.; BIEN, Clara M.; LEE, Hyeseung; ESPENSHADE, Peter J.; KWON-CHUNG, Kyung J. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 64, n. 3, p. 614–629, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05676.x.

CHANG, Yun C.; TSAI, Huei-Fung; KAROS, Marvin; KWON-CHUNG, K. J. THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, [S. l.], v. 41, n. 9, p. 888–896, 2004. DOI: 10.1016/j.fgb.2004.06.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184504000945>.

CHILDERS, Delma S. et al. The Rewiring of Ubiquitination Targets in a Pathogenic Yeast Promotes Metabolic Flexibility, Host Colonization and Virulence. **PLOS Pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. e1005566, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005566. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005566>.

CHUN, Cheryl D.; LIU, Oliver W.; MADHANI, Hiten D. A Link between Virulence and Homeostatic Responses to Hypoxia during Infection by the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. e22, 2007. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030022. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0030022>.

CHUNG, Dawoon et al. ChIP-seq and In Vivo Transcriptome Analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA Reveals a New Regulator of the Fungal Hypoxia Response and Virulence. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 11, 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004487.

COLABARDINI, Ana Cristina et al. Heterogeneity in the transcriptional response of the human pathogen *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent caspofungin. **Genetics**, [S. l.], v. 220, n. 1, 2022. DOI: 10.1093/genetics/iyab183. Disponível em: <https://academic.oup.com/genetics/article/doi/10.1093/genetics/iyab183/6414621>.

CRAMER, Robert A.; PERFECT, B. Zachary; PINCHAI, Nadthanan; PARK, Steven; PERLIN, David S.; ASFAW, Yohannes G.; HEITMAN, Joseph; PERFECT, John R.; STEINBACH, William J. Calcineurin Target CrzA Regulates Conidial Germination, Hyphal Growth, and Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 1085–1097, 2008.

DOI: 10.1128/EC.00086-08. Disponível em:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00086-08>.

CRESPO-SEMPERE, A.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. The loss of the inducible *Aspergillus carbonarius* MFS transporter MfsA leads to ochratoxin A overproduction. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 181, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.014. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.014>.

DAGENAIS, Taylor R. T.; KELLER, Nancy P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 447–465, 2009. DOI: 10.1128/CMR.00055-08.

DE CASTRO, Patrícia Alves; CHIARATTO, Jéssica; WINKELSTRÖTER, Lizziane K.; BOM, Vinícius Leite Pedro; RAMALHO, Leandra Naira Zambelli; GOLDMAN, Maria Helena S.; BROWN, Neil Andrew; GOLDMAN, Gustavo H. The Involvement of the Mid1/Cch1/Yvc1 Calcium Channels in *Aspergillus fumigatus* Virulence. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. e103957, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0103957. Disponível em:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103957>.

DE JESUS CARRION, Steven et al. *Aspergillus fumigatus* corneal infection is regulated by chitin synthases and by neutrophil–derived acidic mammalian chitinase. **European Journal of Immunology**, Germany, v. 49, n. 6, p. 918–927, 2019. DOI: 10.1002/eji.201847851. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201847851>.

DE VRIES, Ronald P.; VISSER, Jaap. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, United States, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001. DOI: 10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001. Disponível em:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>.

DENNING, D. W. Calling upon all public health mycologists. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 923–924, 2017. DOI: 10.1007/s10096-017-2909-8. Disponível em:
<http://link.springer.com/10.1007/s10096-017-2909-8>.

DENNING, David W.; PLEUVRY, Alex; COLE, Donald C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication

chronic pulmonary aspergillosis in adults. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 361–370, 2013. DOI: 10.3109/13693786.2012.738312.

DINAMARCO, Taísa Magnani et al. Functional characterization of an *Aspergillus fumigatus* calcium transporter (PmcA) that is essential for fungal infection. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 5, 2012. a. DOI: 10.1371/journal.pone.0037591.

DINAMARCO, Taísa Magnani; ALMEIDA, Ricardo S.; DE CASTRO, Patrícia Alves; BROWN, Neil Andrew; DOS REIS, Thaila Fernanda; RAMALHO, Leandra Naira Zambelli; SAVOLDI, Marcela; GOLDMAN, Maria Helena S.; GOLDMAN, Gustavo Henrique. Molecular characterization of the putative transcription factor SebA involved in virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 518–531, 2012. b. DOI: 10.1128/EC.00016-12.

DO, Jin Hwan; YAMAGUCHI, Rui; MIYANO, Satoru. Exploring temporal transcription regulation structure of *Aspergillus fumigatus* in heat shock by state space model. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 306, 2009. DOI: 10.1186/1471-2164-10-306. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-306>.

DOS SANTOS, Renato A. C.; STEENWYK, Jacob L.; RIVERO-MENENDEZ, Olga; MEAD, Matthew E.; SILVA, Lilian P.; BASTOS, Rafael W.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana; GOLDMAN, Gustavo H.; ROKAS, Antonis. Genomic and Phenotypic Heterogeneity of Clinical Isolates of the Human Pathogens *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus lentulus*, and *Aspergillus fumigati*affinis. **Frontiers in Genetics**, [S. l.], v. 11, n. May, p. 1–17, 2020. DOI: 10.3389/fgene.2020.00459.

DOS SANTOS, Renato Augusto Corrêa; MEAD, Matthew E.; STEENWYK, Jacob L.; RIVERO-MENÉNDEZ, Olga; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana; GOLDMAN, Gustavo Henrique; ROKAS, Antonis. Examining Signatures of Natural Selection in Antifungal Resistance Genes Across *Aspergillus* Fungi. **Frontiers in Fungal Biology**, [S. l.], v. 2, n. September, p. 1–12, 2021. DOI: 10.3389/ffunb.2021.723051.

ENGIN, Ayse Basak; ENGIN, Atilla. DNA damage checkpoint response to aflatoxin B1. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 65, p.

90–96, 2019. DOI: 10.1016/j.etap.2018.12.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.12.006>.

ESPESO, Eduardo A. The CRaZy Calcium Cycle. *Em: Advances in Experimental Medicine and Biology*. [s.l.: s.n.]. v. 892p. 169–186. DOI: 10.1007/978-3-319-25304-6_7. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25304-6_7.

FABRI, João Henrique Tadini Marilhano; ROCHA, Marina Campos; FERNANDES, Caroline Mota; PERSINOTI, Gabriela Felix; RIES, Laure Nicolas Annick; CUNHA, Anderson Ferreira Da; GOLDMAN, Gustavo Henrique; DEL POETA, Maurizio; MALAVAZI, Iran. The Heat Shock Transcription Factor HsfA Is Essential for Thermotolerance and Regulates Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 12, n. April, p. 1–22, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.656548. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.656548/full>.

FASOYIN, Opemipo Esther; YANG, Kunlong; QIU, Mengguang; WANG, Bin; WANG, Sen; WANG, Shihua. Regulation of morphology, aflatoxin production, and virulence of *aspergillus flavus* by the major nitrogen regulatory gene area. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 12, 2019. DOI: 10.3390/toxins11120718.

FEDOROVA, Natalie D. et al. Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 4, n. 4, 2008. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000046.

FERREIRA, Márcia Eliana da Silva; MALAVAZI, Iran; SAVOLDI, Marcela; BRAKHAGE, Axel A.; GOLDMAN, Maria Helena S.; KIM, H. Stanley; NIERMAN, William C.; GOLDMAN, Gustavo H. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. **Current Genetics**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 32–44, 2006. DOI: 10.1007/s00294-006-0073-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-006-0073-2>.

FLEMMING, Hans Curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2415. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>.

FRAÇ, Magdalena; JEZIERSKA-TYS, Stefania; YAGUCHI, Takashi. Occurrence, Detection, and Molecular and Metabolic Characterization of Heat-Resistant Fungi in Soils and Plants and Their Risk to Human Health. *Em: SPARKS, Donald L. B. T. Advances in Agronomy (org.)*. [s.l.] : Academic Press,

2015. v. 132p. 161–204. DOI: 10.1016/bs.agron.2015.02.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211315000437>.

FUJII, Isao; YASUOKA, Yoshinori; TSAI, Huei Fung; CHANG, Yun C.; KWON-CHUNG, K. J.; EBIZUKAL, Yutaka. Hydrolytic polyketide shortening by Ayg1p, a novel enzyme involved in fungal melanin biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 279, n. 43, p. 44613–44620, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M406758200. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M406758200>.

GAO, Liman; LIU, Yueqin; SUN, Hun; LI, Chun; ZHAO, Zhiping; LIU, Guiyan. Advances in mechanisms and modifications for rendering yeast thermotolerance. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 121, n. 6, p. 599–606, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.11.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.11.002>.

GAUTIER, M.; NORMAND, A. C.; RANQUE, S. Previously unknown species of *Aspergillus*. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 662–669, 2016. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.05.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.013>.

GERWIEN, Franziska; SKRAHINA, Volha; KASPER, Lydia; HUBE, Bernhard; BRUNKE, Sascha. Metals in fungal virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 1–21, 2018. DOI: 10.1093/femsre/fux050.

GRAHL, Nora; DINAMARCO, Taisa Magnani; WILLGER, Sven D.; GOLDMAN, Gustavo H.; CRAMER, Robert A. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 84, n. 2, p. 383–399, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08034.x.

GRESNIGT, Mark S. et al. A Polysaccharide Virulence Factor from *Aspergillus fumigatus* Elicits Anti-inflammatory Effects through Induction of Interleukin-1 Receptor Antagonist. **PLOS Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. e1003936, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003936>.

GROSSE, Christina; HEINEKAMP, Thorsten; KNIEMEYER, Olaf; GEHRKE, Alexander; BRAKHAGE, Axel A. Protein kinase A regulates growth, sporulation, and pigment formation in *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 74, n. 15, p. 4923–4933, 2008. DOI: 10.1128/AEM.00470-08.

GRUNDMANN, Alexander; KUZNETSOVA, Tatyana; AFIYATULLOV, Shamil Sh.; LI, Shu-Ming. FtmPT2, an N -Prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus* , Catalyses the Last Step in the Biosynthesis of Fumitremorgin B. **ChemBioChem**, [S. l.], v. 9, n. 13, p. 2059–2063, 2008. DOI: 10.1002/cbic.200800240. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbic.200800240>.

GUPTA, Kalpana et al. International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. e103–e120, 2011. DOI: 10.1093/cid/ciq257. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciq257>.

HAAS, Hubertus. Iron - a key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. FEB, p. 1–10, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00028.

HAAS, Hubertus. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. **Nat. Prod. Rep.**, [S. l.], v. 31, n. 10, p. 1266–1276, 2014. DOI: 10.1039/C4NP00071D. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C4NP00071D>.

HAGAG, Shelly; KUBITSCHEK-BARREIRA, Paula; NEVES, Gabriela W. P.; AMAR, David; NIERMAN, William; SHALIT, Itamar; SHAMIR, Ron; LOPES-BEZERRA, Leila; OSHEROV, Nir. Transcriptional and Proteomic Analysis of the *Aspergillus fumigatus* Δ prtT Protease-Deficient Mutant. **PLoS ONE**, Department of Clinical Microbiology and Immunology, Sackler School of Medicine Ramat-Aviv, Tel-Aviv, Israel., v. 7, n. 4, p. e33604, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0033604. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/22514608>.

HENDRICKSON, Lee; DAVIS, C. Ray; ROACH, Claudia; NGUYEN, Di Kim; ALDRICH, Teri; MCADA, Phyllis C.; REEVES, Christopher D. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. **Chemistry and Biology**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 429–439, 1999. DOI: 10.1016/S1074-5521(99)80061-1.

HENSEL, M.; ARST JR, H. N.; AUFAUVRE-BROWN, A.; HOLDEN, D. W. The role of the *Aspergillus fumigatus* areA gene in invasive pulmonary aspergillosis.

Molecular and General Genetics MGG, [S. l.], v. 258, n. 5, p. 553–557, 1998.

DOI: 10.1007/s004380050767. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s004380050767>.

HOKKEN, Margriet W. J.; ZOLL, Jan; COOLEN, Jordy P. M.; ZWAAN, Bas J.; VERWEIJ, Paul E.; MELCHERS, Willem J. G. Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; An expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–17, 2019. DOI: 10.1186/s12864-018-5255-z.

HONG, Seung-Beom; KIM, Dae-Ho; PARK, In-Cheol; SAMSON, Robert A.; SHIN, Hyeon-Dong. Isolation and Identification of *Aspergillus Section Fumigati* Strains from Arable Soil in Korea. **Mycobiology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 1, 2010.

DOI: 10.4489/MYCO.2010.38.1.001. Disponível em:

<http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4489/MYCO.2010.38.1.001>.

HOUBRAKEN, J. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 95, p. 5–169, 2020. DOI: 10.1016/j.simyco.2020.05.002.

HOUBRAKEN, Jos; DE VRIES, Ronald P.; SAMSON, Robert A. Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. *Em: Advances in Applied Microbiology*. 1. ed. [s.l.] : Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved., 2014. v. 86p. 199–249. DOI: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>.

HOUBRAKEN, Jos; DYER, Paul S. Induction of the Sexual Cycle in Filamentous Ascomycetes. *Em: VAN DEN BERG, Marco A.; MARUTHACHALAM, Karunakaran (org.)*. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 23–46. DOI: 10.1007/978-3-319-10503-1_2. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-10503-1_2.

HOUBRAKEN, Jos; WEIG, Michael; GROB, Uwe; MEIJER, Martin; BADER, Oliver. *Aspergillus oerlinghausenensis*, a new mould species closely related to *a. fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 363, n. 3, 2015. DOI: 10.1093/femsle/fnv236.

HUBKA, V. et al. Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*): opportunistic human and animal pathogens

capable of interspecific hybridization. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 142–174, 2018. DOI: 10.3767/persoonia.2018.41.08. Disponible em: <https://www.ingentaconnect.com/content/10.3767/persoonia.2018.41.08>.

HUGHES, Adam L.; TODD, Bridget L.; ESPENSHADE, Peter J. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. **Cell**, [S. l.], v. 120, n. 6, p. 831–842, 2005. DOI: 10.1016/j.cell.2005.01.012.

HYNES, Michael J.; MURRAY, Sandra L.; ANDRIANOPOULOS, Alex; DAVIS, Meryl A. Role of carnitine acetyltransferases in acetyl coenzyme a metabolism in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 547–555, 2011. DOI: 10.1128/EC.00295-10.

IBRAHIM-GRANET, O.; PHILIPPE, B.; BOLETI, H.; BOISVIEUX-ULRICH, E.; GRENET, D.; STERN, M.; LATGÉ, J. P. Phagocytosis and Intracellular Fate of *Aspergillus fumigatus* Conidia in Alveolar Macrophages. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 71, n. 2, p. 891–903, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.2.891-903.2003. Disponible em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.71.2.891-903.2003>.

ICHISHIMA, Eiji. Development of enzyme technology for *aspergillus oryzae*, *A. Sojiae*, and *luchuensis*, the national fungi of Japan. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [S. l.], v. 80, n. 9, p. 1681–1692, 2016. DOI: 10.1080/09168451.2016.1177445. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2016.1177445>.

IMBERT, S. et al. Multicentric Analysis of the Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Cryptic Isolates from *Aspergillus* Section *Fumigati*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 64, n. 12, 2020. DOI: 10.1128/AAC.01374-20.

IMBERT, Sebastien et al. Invasive aspergillosis due to *Aspergillus* cryptic species: A prospective multicentre study. **Mycoses**, [S. l.], v. 64, n. 11, p. 1346–1353, 2021. DOI: 10.1111/myc.13348.

JACKSON, Jennifer C.; HIGGINS, Laura A.; LIN, Xiaorong. Conidiation Color Mutants of *Aspergillus fumigatus* Are Highly Pathogenic to the Heterologous Insect Host *Galleria mellonella*. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. e4224, 2009. Disponible em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004224>.

JAIN, Radhika; VALIANTE, Vito; REMME, Nicole; DOCIMO, Teresa; HEINEKAMP, Thorsten; HERTWECK, Christian; GERSHENZON, Jonathan; HAAS, Hubertus; BRAKHAGE, Axel A. The MAP kinase MpkA controls cell wall integrity, oxidative stress response, gliotoxin production and iron adaptation in *Aspergillus fumigatus*. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 39–53, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07778.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2011.07778.x>.

JEANVOINE, A.; ROCCHI, S.; REBOUX, G.; CRINI, N.; CRINI, G.; MILLON, L. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in sawmills of Eastern France. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 123, n. 1, p. 172–184, 2017. DOI: 10.1111/jam.13488.

JUVVADI, Praveen R. et al. Phosphorylation of Calcineurin at a Novel Serine-Proline Rich Region Orchestrates Hyphal Growth and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. e1003564, 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003564. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003564>.

JUVVADI, Praveen R.; MA, Yan; RICHARDS, Amber D.; SODERBLOM, Erik J.; MOSELEY, M. Arthur; LAMOTH, Frédéric; STEINBACH, William J. Identification and mutational analyses of phosphorylation sites of the calcineurin-binding protein CbpA and the identification of domains required for calcineurin binding in *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. MAR, p. 1–10, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00175. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00175/abstract>.

JUVVADI, Praveen R.; PEMBLE, Charles W.; MA, Yan; STEINBACH, William J. Novel motif in calcineurin catalytic subunit is required for septal localization of calcineurin in *Aspergillus fumigatus*. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 590, n. 4, p. 501–508, 2016. DOI: 10.1002/1873-3468.12075. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.12075>.

JUVVADI, Praveen Rao; FORTWENDEL, Jarrod R.; ROGG, Luise E.; BURNS, Kimberlie A.; RANDELL, Scott H.; STEINBACH, William J. Localization and activity of the calcineurin catalytic and regulatory subunit complex at the septum is essential for hyphal elongation and proper septation in *Aspergillus fumigatus*. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 82, n. 5, p. 1235–1259, 2011. DOI:

10.1111/j.1365-2958.2011.07886.x. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2011.07886.x>.

JUVVADI, Praveen; STEINBACH, William. Calcineurin Orchestrates Hyphal Growth, Septation, Drug Resistance and Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*: Where Do We Go from Here? **Pathogens**, Switzerland, v. 4, n. 4, p. 883–893, 2015. DOI: 10.3390/pathogens4040883. Disponível em:
<http://www.mdpi.com/2076-0817/4/4/883>.

KÄFER, Etta. Meiotic and Mitotic Recombination in *Aspergillus* and Its Chromosomal Aberrations. *Em: CASPARI, E. W. B. T. Advances in Genetics (org.). [s.l.] : Academic Press, 1977. v. 19p. 33–131.* DOI: 10.1016/S0065-2660(08)60245-X. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006526600860245X>.

KAPLAN, Craig D.; KAPLAN, Jerry. Iron acquisition and transcriptional regulation. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 109, n. 10, p. 4536–4552, 2009. DOI: 10.1021/cr9001676.

KELLER, Sophia; MACHELEIDT, Juliane; SCHERLACH, Kirstin; SCHMALER-RIPCKE, Jeannette; JACOBSEN, Ilse D.; HEINEKAMP, Thorsten; BRAKHAGE, Axel A. Pyomelanin Formation in *Aspergillus fumigatus* Requires HmgX and the Transcriptional Activator HmgR but Is Dispensable for Virulence. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. e26604, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0026604. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0026604>.

KERKAERT, Joshua D.; LE MAUFF, François; WUCHER, Benjamin R.; BEATTIE, Sarah R.; VESELY, Elisa M.; SHEPPARD, Donald C.; NADELL, Carey D.; CRAMER, Robert A. An Alanine Aminotransferase Is Required for Biofilm-Specific Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Echinocandin Treatment. **mBio**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 1–21, 2022. DOI: 10.1128/mbio.02933-21. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.02933-21>.

KLICH, Maren A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 21–27, 2002. DOI: 10.1080/15572536.2003.11833245.

KOCSUBÉ, S. et al. *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 199–213, 2016. DOI: 10.1016/j.simyco.2016.11.006. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/10.1016/j.simyco.2016.11.006>.

KONTOYIANNIS, Dimitrios P. et al. Prospective Surveillance for Invasive Fungal Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients, 2001–2006: Overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 50, n. 8, p. 1091–1100, 2010. DOI: 10.1086/651263. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/651263>.

KOSMIDIS, Chris; DENNING, David W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Thorax**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 270–277, 2015. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2014-206291.

KOWALSKI, Caitlin H.; KERKAERT, Joshua D.; LIU, Ko Wei; BOND, Matthew C.; HARTMANN, Raimo; NADELL, Carey D.; STAJICH, Jason E.; CRAMER, Robert A. Fungal biofilm morphology impacts hypoxia fitness and disease progression. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 2430–2441, 2019. DOI: 10.1038/s41564-019-0558-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0558-7>.

KROLL, Kristin et al. Identification of hypoxia-inducible target genes of *Aspergillus fumigatus* by transcriptome analysis reveals cellular respiration as an important contributor to hypoxic survival. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1241–1253, 2014. DOI: 10.1128/EC.00084-14.

KUMAR, Anoop; REDDY, Lekkala V.; SOCHANIK, Aleksander; KURUP, Viswanath P. Isolation and characterization of a recombinant heat shock protein of *Aspergillus fumigatus*. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 91, n. 5, p. 1024–1030, 1993. DOI: 10.1016/0091-6749(93)90215-2.

KWON-CHUNG, Kyung J.; SUGUI, Janyce A. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? **Medical Mycology**, [S. l.], v. 47, n. s1, p. S97–S103, 2009. DOI: 10.1080/13693780802056012. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13693780802056012>.

KWON-CHUNG, Kyung J.; SUGUI, Janyce A. *Aspergillus fumigatus*—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. e1003743, 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003743. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003743>.

KYRMIZI, Irene et al. Calcium sequestration by fungal melanin inhibits calcium-calmodulin signalling to prevent LC3-associated phagocytosis. **Nature**

Microbiology, [S. l.], v. 3, n. 7, p. 791–803, 2018. DOI: 10.1038/s41564-018-0167-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-018-0167-x>.

LAMARRE, Claude; SOKOL, Sergueï; DEBEAUPUIS, Jean Paul; HENRY, Christine; LACROIX, Céline; GLASER, Philippe; COPPÉE, Jean Yves; FRANÇOIS, Jean Marie; LATGÉ, Jean Paul. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 9, p. 1–15, 2008. DOI: 10.1186/1471-2164-9-417.

LAMOTH, Frédéric. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. MAY, p. 1–8, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00683. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00683/abstract>.

LAMOTH, Frédéric; JUVVADI, Praveen R.; GEHRKE, Christopher; ASFAW, Yohannes G.; STEINBACH, William J. Transcriptional Activation of Heat Shock Protein 90 Mediated Via a Proximal Promoter Region as Trigger of Caspofungin Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 209, n. 3, p. 473–481, 2014. DOI: 10.1093/infdis/jit530. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jit530>.

LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 310–350, 1999. DOI: 10.1128/CMR.12.2.310. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.310>.

LATGÉ, Jean-Paul; CHAMILOS, Georgios. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 310–350, 2019. DOI: 10.1128/CMR.00140-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00140-18>.

LI, Yuanning et al. A genome-scale phylogeny of Fungi; insights into early evolution, radiations, and the relationship between taxonomy and phylogeny. **bioRxiv**, [S. l.], p. 2020.08.23.262857, 2020. DOI: 10.1101/2020.08.23.262857. Disponível em: <http://biorxiv.org/content/early/2020/08/24/2020.08.23.262857.abstract>.

LIND, Abigail L.; WISECAVER, Jennifer H.; LAMEIRAS, Catarina; WIEMANN, Philipp; PALMER, Jonathan M.; KELLER, Nancy P.; RODRIGUES, Fernando; GOLDMAN, Gustavo H.; ROKAS, Antonis. Drivers of genetic diversity in secondary metabolic gene clusters within a fungal species. **PLoS Biology**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 1–26, 2017. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003583.

LIU, Hong et al. *Aspergillus fumigatus* AcuM regulates both iron acquisition and gluconeogenesis. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 78, n. 4, p. 1038–1054, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07389.x.

LODEIRO, Silvia; XIONG, Quanbo; WILSON, William K.; IVANOVA, Yulia; SMITH, Mckenzie L.; MAY, Gregory S.; MATSUDA, Seiichi P. T. Protostadienol biosynthesis and metabolism in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Organic Letters**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 1241–1244, 2009. DOI: 10.1021/ol802696a.

MAHMOODI, Niusha; TANNER, Martin E. Potential rearrangements in the reaction catalyzed by the indole prenyltransferase FtmPT1. **ChemBioChem**, [S. l.], v. 14, n. 15, p. 2029–2037, 2013. DOI: 10.1002/cbic.201300385.

MANENTE, Myriam; GHISLAIN, Michel. The lipid-translocating exporter family and membrane phospholipid homeostasis in yeast. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 673–687, 2009. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00513.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2009.00513.x>.

MANFIOLLI, Adriana Oliveira et al. *Aspergillus fumigatus* protein phosphatase PpzA is involved in iron assimilation, secondary metabolite production, and virulence. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 1–24, 2017. DOI: 10.1111/cmi.12770.

MANFIOLLI, Adriana Oliveira et al. Mitogen activated protein kinases (MAPK) and protein phosphatases are involved in *Aspergillus fumigatus* adhesion and biofilm formation. **Cell Surface**, [S. l.], v. 1, n. December, p. 43–56, 2018. DOI: 10.1016/j.tcs.2018.03.002.

MARTINS, Margarida; UPPULURI, Priya; THOMAS, Derek P.; CLEARY, Ian A.; HENRIQUES, Mariana; LOPEZ-RIBOT, José L.; OLIVEIRA, Rosário. Presence of extracellular DNA in the candida albicans biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 169, n. 5, p. 323–331, 2010. DOI: 10.1007/s11046-009-9264-y.

MATTERN, Derek J. et al. Identification of the antiphagocytic trypanidin gene cluster in the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 99, n. 23, p. 10151–10161, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-6898-1.

MOODLEY, Loven; PILLAY, Jehron; DHEDA, Keertan. Aspergilloma and the surgeon. **Journal of Thoracic Disease**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 202–209, 2014. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.40.

MORENO, Miguel Ángel; IBRAHIM-GRANET, Oumaima; VICENTEFRANQUEIRA, Rocío; AMICH, Jorge; AVE, Patrick; LEAL, Fernando; LATGÉ, Jean-Paul; CALERA, José Antonio. The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 1182–1197, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05726.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2007.05726.x>.

MÜLLER, Sebastian; BALDIN, Clara; GROTH, Marco; GUTHKE, Reinhard; KNIEMEYER, Olaf; BRAKHAGE, Axel A.; VALIANTE, Vito. Comparison of transcriptome technologies in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* reveals novel insights into the genome and MpkA dependent gene expression. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2012. DOI: 10.1186/1471-2164-13-519.

NAUSEEF, William M. Isolation of Human Neutrophils From Venous Blood. *Em*: QUINN, Mark T.; DELEO, Frank R.; BOKOCH, Gary M. (org.). Totowa, NJ: Humana Press, 2007. p. 15–20. DOI: 10.1007/978-1-59745-467-4_2. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-467-4_2.

NI, Min; YU, Jae-Hyuk. A Novel Regulator Couples Sporogenesis and Trehalose Biogenesis in *Aspergillus nidulans*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. e970, 2007. DOI: 10.1371/journal.pone.0000970. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0000970>.

NICHOLLS, Susan; LEACH, Michelle D.; PRIEST, Claire L.; BROWN, Alistair J. P. Role of the heat shock transcription factor, Hsf1, in a major fungal pathogen that is obligately associated with warm-blooded animals. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 74, n. 4, p. 844–861, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06883.x.

NIERMAN, William C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, [S. l.], v. 438, n. 7071, p. 1151–1156, 2005. DOI: 10.1038/nature04332.

NOLLEN, Ellen A. A.; BRUNSTING, Jeanette F.; ROELOFSEN, Han; WEBER, Lee A.; KAMPINGA, Harm H. In Vivo Chaperone Activity of Heat Shock Protein

70 and Thermotolerance. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 2069–2079, 1999. DOI: 10.1128/mcb.19.3.2069.

O'MEARA, Teresa R.; COWEN, Leah E. Hsp90-dependent regulatory circuitry controlling temperature-dependent fungal development and virulence. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 473–481, 2014. DOI: 10.1111/cmi.12266.

PARENT-MICHAUD, Maxime; DUFRESNE, Philippe J.; FOURNIER, Éric; MARTINEAU, Christine; MOREIRA, Sandrine; PERKINS, Vincent; DE REPENTIGNY, Louis; DUFRESNE, Simon F. Draft Genome Sequences of Azole-Resistant and Azole-Susceptible *Aspergillus turcosus* Clinical Isolates Recovered from Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples. **Microbiology Resource Announcements**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 19–21, 2019. DOI: 10.1128/MRA.01446-18. Disponible em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MRA.01446-18>.

PARK, Hee-Soo; JUN, Sang-Cheol; HAN, Kap-Hoon; HONG, Seung-Beom; YU, Jae-Hyuk. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus Fungi*. **Advances in applied microbiology**, [S. l.], v. 100, p. 161–202, 2017. DOI: 10.1016/bs.aambs.2017.03.001. Disponible em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216417300187>.

PATTERSON, Thomas F. et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 63, n. 4, p. e1–e60, 2016. DOI: 10.1093/cid/ciw326.

PEREIRA SILVA, Lilian et al. Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakA/HOG1 and MpkC dependent. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 1–21, 2017. DOI: 10.1111/cmi.12681.

PEREZ-CUESTA, Uxue; GURUCEAGA, Xabier; CENDON-SANCHEZ, Saioa; PELEGRI-MARTINEZ, Eduardo; HERNANDO, Fernando L.; RAMIREZ-GARCIA, Andoni; ABAD-DIAZ-DE-CERIO, Ana; REMENTERIA, Aitor. Nitrogen, iron and zinc acquisition: Key nutrients to *aspergillus fumigatus* virulence. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 7, n. 7, 2021. DOI: 10.3390/jof7070518.

PERLIN, David S. Echinocandin Resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 61, n. suppl_6, p. S612–S617, 2015. DOI: 10.1093/cid/civ791. Disponible em: <https://doi.org/10.1093/cid/civ791>.

PINCHAI, Nadthanan; JUVVADI, Praveen Rao; FORTWENDEL, Jarrod R.; ZACHARY PERFECT, B.; ROGG, Luise E.; ASFAW, Yohannes G.; STEINBACH, William J. The aspergillus fumigatus p-type golgi apparatus Ca²⁺/Mn²⁺ ATPase pmra is involved in cation homeostasis and cell wall integrity but is not essential for pathogenesis. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 472–476, 2010. DOI: 10.1128/EC.00378-09.

PRICE, Thomas H. et al. Efficacy of transfusion with granulocytes from G-CSF/dexamethasone-treated donors in neutropenic patients with infection. **Blood**, [S. l.], v. 126, n. 18, p. 2153–2161, 2015. DOI: 10.1182/blood-2015-05-645986.

RAFFA, Nicholas; KELLER, Nancy P. A call to arms: Mustering secondary metabolites for success and survival of an opportunistic pathogen. **PLOS Pathogens**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. e1007606, 2019. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007606. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1007606>.

REIS, Thaila Fernanda Dos; MENINO, João Filipe; BOM, Vinícius Leite Pedro; BROWN, Neil Andrew; COLABARDINI, Ana Cristina; SAVOLDI, Marcela; GOLDMAN, Maria Helena S.; RODRIGUES, Fernando; GOLDMAN, Gustavo Henrique. Identification of glucose transporters in aspergillus nidulans. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 1–15, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0081412.

RIES, Laure N. A.; BEATTIE, Sarah R.; ESPESO, Eduardo A.; CRAMER, Robert A.; GOLDMAN, Gustavo H. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in aspergillus nidulans. **Genetics**, [S. l.], v. 203, n. 1, p. 335–352, 2016. DOI: 10.1534/genetics.116.187872.

RIES, Laure Nicolas Annick et al. The Aspergillus fumigatus CrzA Transcription Factor Activates Chitin Synthase Gene Expression during the Caspofungin Paradoxical Effect. **mBio**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. e00705-17, 2017. DOI: 10.1128/mBio.00705-17. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00705-17>.

RIES, Laure Nicolas Annick et al. Aspergillus fumigatus Acetate Utilization Impacts Virulence Traits and Pathogenicity. **mBio**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 1–23, 2021. DOI: 10.1128/mBio.01682-21.

ROBBINS, Nicole; UPPULURI, Priya; NETT, Jeniel; RAJENDRAN, Ranjith; RAMAGE, Gordon; LOPEZ-RIBOT, Jose L.; ANDES, David; COWEN, Leah E.

Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 7, n. 9, 2011. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002257.

ROCHA, Marina Campos; MINARI, Karine; FABRI, João Henrique Tadini Marilhano; KERKAERT, Joshua D.; GAVA, Lisandra Marques; DA CUNHA, Anderson Ferreira; CRAMER, Robert A.; BORGES, Júlio César; MALAVAZI, Iran. *Aspergillus fumigatus* Hsp90 interacts with the main components of the cell wall integrity pathway and cooperates in heat shock and cell wall stress adaptation. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 23, n. 2, 2021. DOI: 10.1111/cmi.13273.

ROKAS, Antonis; MEAD, Matthew E.; STEENWYK, Jacob L.; OBERLIES, Nicholas H.; GOLDMAN, Gustavo H. Evolving moldy murderers: *Aspergillus* section *Fumigati* as a model for studying the repeated evolution of fungal pathogenicity. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008315.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 141–173, 2014. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.

SAMSON, R. A.; CENTRE, CBS-KNAW Fungal Biodiversity. **Food and Indoor Fungi**. [s.l.] : CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=Az6-ZwEACAAJ>.

SAMSON, R. A.; HONG, S.; PETERSON, S. W.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 59, p. 147–203, 2007. DOI: 10.3114/sim.2007.59.14.

SCHNEIDER, Andreas; BLATZER, Michael; POSCH, Wilfried; SCHUBERT, Ralf; LASS-FLÖRL, Cornelia; SCHMIDT, Stanislaw; LEHRNBECHER, Thomas. *Aspergillus fumigatus* responds to natural killer (NK) cells with upregulation of stress related genes and inhibits the immunoregulatory function of NK cells. **Oncotarget**, [S. l.], v. 7, n. 44, p. 71062–71071, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.12616.

SCHRETTL, Markus et al. SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 27–43, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06376.x.

SCHRETTL, Markus; BIGNELL, Elaine; KRAGL, Claudia; JOECHL, Christoph; ROGERS, Tom; ARST, Herbert N.; HAYNES, Ken; HAAS, Hubertus. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 200, n. 9, p. 1213–1219, 2004. DOI: 10.1084/jem.20041242.

SCHRETTL, Markus; HAAS, Hubertus. Iron homeostasis-Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 400–405, 2011. DOI: 10.1016/j.mib.2011.06.002.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.; VAN DIJCK, P. On the safety of *Aspergillus niger* - A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 59, n. 4–5, p. 426–435, 2002. DOI: 10.1007/s00253-002-1032-6.

SEGAL, Brahm H. Aspergillosis. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 360, n. 18, p. 1870–1884, 2009. DOI: 10.1056/NEJMra0808853. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra0808853>.

SEO, Hyewon; KANG, Suzie; PARK, Yong-Sung; YUN, Cheol-Won. The Role of Zinc in Gliotoxin Biosynthesis of *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 24, p. 6192, 2019. DOI: 10.3390/ijms20246192. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/24/6192>.

SHARMA, Seema; BANERJEE, Kaushik; CHOUDHURY, Partha P. Degradation of chlorimuron-ethyl by *Aspergillus niger* isolated from agricultural soil. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 337, n. 1, p. 18–24, 2012. DOI: 10.1111/1574-6968.12006. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/1574-6968.12006>.

SILVA, Lilian Pereira; HORTA, Maria Augusta Crivelente; GOLDMAN, Gustavo Henrique. Genetic Interactions Between *Aspergillus fumigatus* Basic Leucine Zipper (bZIP) Transcription Factors AtfA, AtfB, AtfC, and AtfD. **Frontiers in Fungal Biology**, [S. l.], v. 2, n. February, 2021. DOI: 10.3389/ffunb.2021.632048.

SISCAR-LEWIN, Sofia; HUBE, Bernhard; BRUNKE, Sascha. Emergence and evolution of virulence in human pathogenic fungi. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 693–704, 2022. DOI: 10.1016/j.tim.2021.12.013.

SNELDERS, Eveline et al. Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread of a Single Resistance Mechanism. **PLoS Medicine**, [S. l.], v. 5, n. 11, p. e219, 2008. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050219. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0050219>.

SONG, Jinxing; ZHAI, Pengfei; ZHANG, Yuanwei; ZHANG, Caiyun; SANG, Hong; HAN, Guanzhu; KELLER, Nancy P.; LU, Ling. The *Aspergillus fumigatus* Damage Resistance Protein Family Coordinately Regulates Ergosterol Biosynthesis and Azole Susceptibility. **mBio**, United States, v. 7, n. 1, p. e01919-15, 2016. DOI: 10.1128/mBio.01919-15. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01919-15>.

SORIANI, Frederico Marianetti; MALAVAZI, Iran; DA SILVA FERREIRA, Márcia Eliana; SAVOLDI, Marcela; VON ZESKA KRESS, Marcia Regina; DE SOUZA GOLDMAN, Maria Helena; LOSS, Omar; BIGNELL, Elaine; GOLDMAN, Gustavo Henrique. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 67, n. 6, p. 1274–1291, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06122.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2008.06122.x>.

SRIRANGANADANE, Dev; WARIDEL, Patrice; SALAMIN, Karine; REICHARD, Utz; GROUZMANN, Eric; NEUHAUS, Jean Marc; QUADRONI, Manfredo; MONOD, Michel. *Aspergillus* protein degradation pathways with different secreted protease sets at neutral and acidic pH. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 3511–3519, 2010. DOI: 10.1021/pr901202z.

SRIVASTAVA, Archita et al. Distinct roles of the 7-transmembrane receptor protein Rta3 in regulating the asymmetric distribution of phosphatidylcholine across the plasma membrane and biofilm formation in *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, India, v. 19, n. 12, p. e12767, 2017. DOI: 10.1111/cmi.12767. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cmi.12767>.

STEENWYK, Jacob L. et al. Variation Among Biosynthetic Gene Clusters, Secondary Metabolite Profiles, and Cards of Virulence Across *Aspergillus* Species. **Genetics**, [S. l.], v. 216, n. 2, p. 481–497, 2020. DOI: 10.1534/genetics.120.303549. Disponível em: <https://academic.oup.com/genetics/article/216/2/481/6066185>.

STEENWYK, Jacob L.; SHEN, Xing-Xing; LIND, Abigail L.; GOLDMAN, Gustavo H.; ROKAS, Antonis. A Robust Phylogenomic Time Tree for Biotechnologically and Medically Important Fungi in the Genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **mBio**, [S. l.], v. 10, n. 4, 2019. DOI: 10.1128/mBio.00925-19. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00925-19>.

STEINBACH, William J.; LAMOTH, Frédéric; JUVVADI, Praveen R. Potential Microbiological Effects of Higher Dosing of Echinocandins. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 61, n. suppl_6, p. S669–S677, 2015. DOI: 10.1093/cid/civ725. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/civ725>.

SUEIRO-OLIVARES, Mónica et al. *Aspergillus fumigatus* transcriptome response to a higher temperature during the earliest steps of germination monitored using a new customized expression microarray. **Microbiology (United Kingdom)**, [S. l.], v. 161, n. 3, p. 490–502, 2015. DOI: 10.1099/mic.0.000021.

SUGUI, Janyce A.; KIM, H. Stanley; ZAREMBER, Kol A.; CHANG, Yun C.; GALLIN, John I.; NIERMAN, William C.; KWON-CHUNG, Kyung J. Genes Differentially Expressed in Conidia and Hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon Exposure to Human Neutrophils. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 3, n. 7, p. e2655, 2008. DOI: 10.1371/journal.pone.0002655. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002655>.

SUGUI, Janyce A.; PETERSON, Stephen W.; FIGAT, Abigail; HANSEN, Bryan; SAMSON, Robert A.; MELLADO, Emilia; CUENCA-ESTRELLA, Manuel; KWON-CHUNG, Kyung J. Genetic Relatedness versus Biological Compatibility between *Aspergillus fumigatus* and Related Species. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 52, n. 10, p. 3707–3721, 2014. DOI: 10.1128/JCM.01704-14. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01704-14>.

TAIPALE, Mikko; JAROSZ, Daniel F.; LINDQUIST, Susan. HSP90 at the hub of protein homeostasis: Emerging mechanistic insights. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 515–528, 2010. DOI: 10.1038/nrm2918.

TAKAZONO, Takahiro; IZUMIKAWA, Koichi. Recent advances in diagnosing chronic pulmonary aspergillosis. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. AUG, p. 1–7, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01810.

TEICHERT, Sabine; WOTTAWA, Marieke; SCHÖNIG, Birgit; TUDZYNSKI, Bettina. Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 5, n. 10, p. 1807–1819, 2006. DOI: 10.1128/EC.00039-06.

THAMMAHONG, Arsa; PUTTIKAMONKUL, Srisombat; PERFECT, John R. crossm Central Role of the Trehalose Biosynthesis Pathway in the Pathogenesis of Human Fungal Infections: Opportunities and Challenges for Therapeutic Development. [S. l.], 2017.

THOMPSON, Seona; CROFT, Nirvana J.; SOTIRIOU, Antonis; PIGGINS, Hugh D.; CROSTHWAITE, Susan K. *Neurospora crassa* heat shock factor 1 is an essential gene; a second heat shock factor-like gene, *hsf2*, is required for asexual spore formation. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 1573–1581, 2008. DOI: 10.1128/EC.00427-07.

THROCKMORTON, Kurt; LIM, Fang Yun; KONTOYIANNIS, Dimitrios P.; ZHENG, Weifa; KELLER, Nancy P. Redundant synthesis of a conidial polyketide by two distinct secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 246–259, 2016. DOI: 10.1111/1462-2920.13007.

TOMODA, Hiroshi; TABATA, Noriko; NAKATA, Yumi; NISHIDA, Hiroyuki; KANEKO, Takushi; OBATA, Rika; SUNAZUKA, Toshiaki; ŌMURA, Satoshi. Biosynthesis of Pyripyropene A. **The Journal of Organic Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 882–886, 1996. DOI: 10.1021/jo951424s. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jo951424s>.

TONG, Xunliang; XU, Hongtao; ZOU, Lihui; CAI, Meng; XU, Xuefeng; ZHAO, Zuotao; XIAO, Fei; LI, Yanming. High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 39606, 2017. DOI: 10.1038/srep39606. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep39606>.

TSANG, Chi Ching; TANG, James Y. M.; LAU, Susanna K. P.; WOO, Patrick C. Y. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 16, p. 197–210, 2018. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.05.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.05.003>.

UEKI, Shigeharu; HEBISAWA, Akira; KITANI, Masashi; ASANO, Koichiro; NEVES, Josiane S. Allergic bronchopulmonary aspergillosis-A luminal hypereosinophilic disease with extracellular trap cell death. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. OCT, p. 1–9, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02346.

VACHER, Gaëlle; NICULITA-HIRZEL, Hélène; ROGER, Thierry. Immune responses to airborne fungi and non-invasive airway diseases. **Seminars in Immunopathology**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 83–96, 2015. DOI: 10.1007/s00281-014-0471-3.

VALSECCHI, Isabel et al. The Role of RodA-Conserved Cysteine Residues in the *Aspergillus fumigatus* Conidial Surface Organization. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 151, 2020. DOI: 10.3390/jof6030151. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/3/151>.

VAN DE VEERDONK, Frank L.; GRESNIGT, Mark S.; ROMANI, Luigina; NETEA, Mihai G.; LATGÉ, Jean Paul. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 661–674, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.90. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.90>.

VAN DER STRAAT, Laura; VERNOOIJ, Marloes; LAMMERS, Marieke; VAN DEN BERG, Willy; SCHONEWILLE, Tom; CORDEWENER, Jan; VAN DER MEER, Ingrid; KOOPS, Andries; DE GRAAFF, Leo H. Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1186/1475-2859-13-11.

VOLTERSEN, Vera et al. Proteome Analysis Reveals the Conidial Surface Protein CcpA Essential for Virulence of the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. **mBio**, United States, v. 9, n. 5, 2018. DOI: 10.1128/mBio.01557-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01557-18>.

WAGENER, Johannes; ECHTENACHER, Bernd; ROHDE, Manfred; KOTZ, Andrea; KRAPPMANN, Sven; HEESEMANN, Jürgen; EBEL, Frank. The Putative α -1,2-Mannosyltransferase AfMnt1 of the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Is Required for Cell Wall Stability and Full Virulence. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 1661–1673, 2008. DOI:

10.1128/EC.00221-08.

Disponível

em:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00221-08>.

WAGENER, Johannes; LOIKO, Veronika. Recent insights into the paradoxical effect of echinocandins. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 4, n. 1, 2018. DOI: 10.3390/jof4010005.

WALLNER, Anja; BLATZER, Michael; SCHRETTL, Markus; SARG, Bettina; LINDNER, Herbert; HAAS, Hubertus. Ferricrocin, a siderophore involved in intra- and transcellular iron distribution in *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 75, n. 12, p. 4194–4196, 2009. DOI: 10.1128/AEM.00479-09.

WÉRY, Nathalie. Bioaerosols from composting facilities-a review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 4, n. APR, p. 1–9, 2014. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00042.

WIEDERRECHT, Greg; SETO, Donald; PARKER, Carl S. Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. **Cell**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 841–853, 1988. DOI: 10.1016/S0092-8674(88)91197-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286748891197X>.

WILLGER, Sven D. et al. A Sterol-Regulatory Element Binding Protein Is Required for Cell Polarity, Hypoxia Adaptation, Azole Drug Resistance, and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 4, n. 11, p. e1000200, 2008. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000200. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000200>.

WILLGER, Sven; GRAHL, Nora; CRAMER, Robert A. *Aspergillus fumigatus* metabolism: Clues to mechanisms of in vivo fungal growth and virulence. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 47, n. SUPPL. 1, p. 1–12, 2009. DOI: 10.1080/13693780802455313.

YANG, Dong Hoon et al. **Rewiring of signaling networks modulating thermotolerance in the human pathogen *Cryptococcus neoformans***. [s.l.: s.n.]. v. 205 DOI: 10.1534/genetics.116.190595.

ZARNOWSKI, Robert et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **mBio**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 1–13, 2014. DOI: 10.1128/mBio.01333-14.

ZHAO, Shu; MARTIN-VICENTE, Adela; COLABARDINI, Ana Cristina; PEREIRA SILVA, Lilian; RINKER, David C.; FORTWENDEL, Jarrod R.;

GOLDMAN, Gustavo Henrique; GIBBONS, John G. Genomic and Molecular Identification of Genes Contributing to the Caspofungin Paradoxical Effect in *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 10, n. 5, 2022. DOI: 10.1128/spectrum.00519-22. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.00519-22>.

ZHOU, Hui; HU, Hongyan; ZHANG, Lijuan; LI, Ruoyu; OUYANG, Haomiao; MING, Jia; JIN, Cheng. O-mannosyltransferase 1 in *Aspergillus fumigatus* (AfPmt1p) is crucial for cell wall integrity and conidium morphology, especially at an elevated temperature. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 2260–2268, 2007. DOI: 10.1128/EC.00261-07.