



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
RIBEIRÃO PRETO**



**Estudos moleculares de isolados clínicos do gênero
Aspergillus de diferentes sítios anatômicos**

Lívia Maria Maciel da Fonseca

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos moleculares de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* de diferentes sítios anatômicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Bioagentes e Biotecnologia aplicados à Farmácia

Orientada: Lívia Maria Maciel da Fonseca

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 11/05/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto – SP
2022**

RESUMO

FONSECA, L.M.M. **Estudos moleculares de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* de diferentes sítios anatômicos.** 2022. 93f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aspergillus é um gênero de fungos filamentosos de distribuição universal que abriga espécies que são capazes de gerar diversos tipos de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Diversas espécies de *Aspergillus* vêm apresentando resistência aos antifúngicos clinicamente disponíveis para o tratamento de infecções. Neste projeto foram estudados 51 isolados clínicos do gênero *Aspergillus* oriundos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo quanto a sua morfologia, identificação molecular, susceptibilidade aos antifúngicos, resistência aos azóis, fatores de virulência e virulência no modelo alternativo *Galleria mellonella*. Na análise morfológica foram estudadas a macromorfologia da colônia gigante e a micromorfologia da estrutura de reprodução assexuada dos fungos. A identificação molecular de *Aspergillus* seções *Fumigati* e *Flavi* e respectivas espécies foi realizada pelo sequenciamento da região *internal transcribed spacer* (ITS) do DNA ribossômico (rDNA) e dos genes codificadores da β -tubulina (*benA*) e calmodulina (*caM*). A susceptibilidade dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. ao Itraconazol (ITR), Posaconazol (POS), Voriconazol (VOR) e Anfotericina B (AMB) foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo baseado no protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). O gene *cyp51A* e respectiva região promotora foram sequenciados para estudo de mecanismo de resistência aos azóis. Os fatores de virulência foram estudados quanto ao tamanho do conídio, termotolerância e biofilme (biomassa e matriz). Entre os 51 isolados clínicos deste estudo, 80% (n=41/51) e 20% (n=10/51) foram identificados como *A. fumigatus sensu stricto* e *A. flavus*, respectivamente. Entre eles, 68,6% (n=35/51) apresentaram a AMB com valores da concentração inibitória mínima (CIM) igual ou superior ao *epidemiological cutoff value* (ECV) e 41,5% (n=21/51) apresentaram a CIM dos azóis maior que o ECV, isto é, perfil não selvagem a estes antifúngicos. Foram identificadas 9 diferentes mutações de nucleotídeos no gene *cyp51A*, sendo que 3 são mutações silenciosas e 6 são mutações com baixa relação a resistência aos azóis. Quanto aos fatores de virulência, os isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* apresentam pequenos conídios e foram termotolerantes, enquanto os isolados clínicos *A. flavus* apresentam conídios com maior dimensão e não foram termotolerantes, o que justifica a maior porcentagem de isolados clínicos *A. fumigatus* entre os isolados clínicos deste estudo. Quanto à formação de biofilme, ambas espécies tiveram desde baixa à alta formação, sendo que *A. flavus* foi a espécie que apresentou isolados clínicos com maior formação de biofilme. Quando avaliada a virulência em *G. mellonella*, foi observado que *A. flavus* apresentam maior virulência quando comparados com os isolados clínicos de *A. fumigatus*. Associando esses dados, pode-se sugerir que a maior virulência está associada com a maior capacidade de formação de biofilme.

Palavras-chave: *Aspergillus*, identificação molecular, biofilme, resistência aos azóis, *cyp51A*, *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

FONSECA, L.M.M. **Molecular studies of clinical isolates of the *Aspergillus* genus from different anatomical sites.** 2022. 93f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aspergillus is a genus of filamentous fungi of universal distribution that harbors species that can generate different infections, mainly in immunocompromised individuals. Several species of *Aspergillus* have shown resistance to antifungals that are clinically available for the treatment of infection conditions. In this project, 51 clinical isolates of the genus *Aspergillus* from patients at the Clinical Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – University of São Paulo) were studied regarding their morphology, molecular identification, susceptibility to antifungal agents, azole resistance, virulence factors, and virulence in the alternative model *Galleria mellonella*. The macromorphology of the giant colony and the micromorphology of the asexual reproduction structure of the fungi were studied. Molecular identification of *Aspergillus* sections *Fumigati* and *Flavi* and species was performed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA) and the genes encoding β -tubulin (*benA*) and calmodulin (*caM*). The susceptibility of clinical isolates of *Aspergillus* spp. to itraconazole (ITR), posaconazole (POS), voriconazole (VOR), and amphotericin B (AMB) was evaluated by the broth microdilution method based on the M38-A2 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The *cyp51A* gene and its promoter region were sequenced to study the mechanism of resistance to azoles. Analyzed virulence factors were conidia size, thermotolerance, and biofilm (biomass and matrix). Among the 51 clinical isolates in this study, 80% (n=41/51) and 20% (n=10/51) were identified as *A. fumigatus sensu stricto* and *A. flavus*, respectively. Among them, 68.6% (n=35/51) presented AMB minimal inhibitory concentration (MIC) values equal to or greater than the ECV, and 41.5% (n=21/51) showed the azoles MIC greater than the ECV, i.e., non-wild type profile to these antifungals. Nine different nucleotide mutations were identified in the *cyp51A* gene, 3 of which are silent mutations and 6 are mutations with a low relation to azole resistance. *A. fumigatus sensu stricto* clinical isolates had small conidia and were thermotolerant. In contrast, *A. flavus* clinical isolates had larger conidia and were not thermotolerant, which justifies the higher percentage of *A. fumigatus* among the clinical isolates in this study. Both species had low to high biofilm formation. However, *A. flavus* clinical isolates presented more significant biofilm formation. Additionally, *A. flavus* clinical isolates showed higher virulence when compared to *A. fumigatus sensu stricto* clinical isolates. Linking these data, we can suggest that higher virulence seems to be associated with higher biofilm formation.

Keywords: *Aspergillus*, molecular identification, azole resistance, biofilm formation, *cyp51A*, *Galleria mellonella*.

1. INTRODUÇÃO

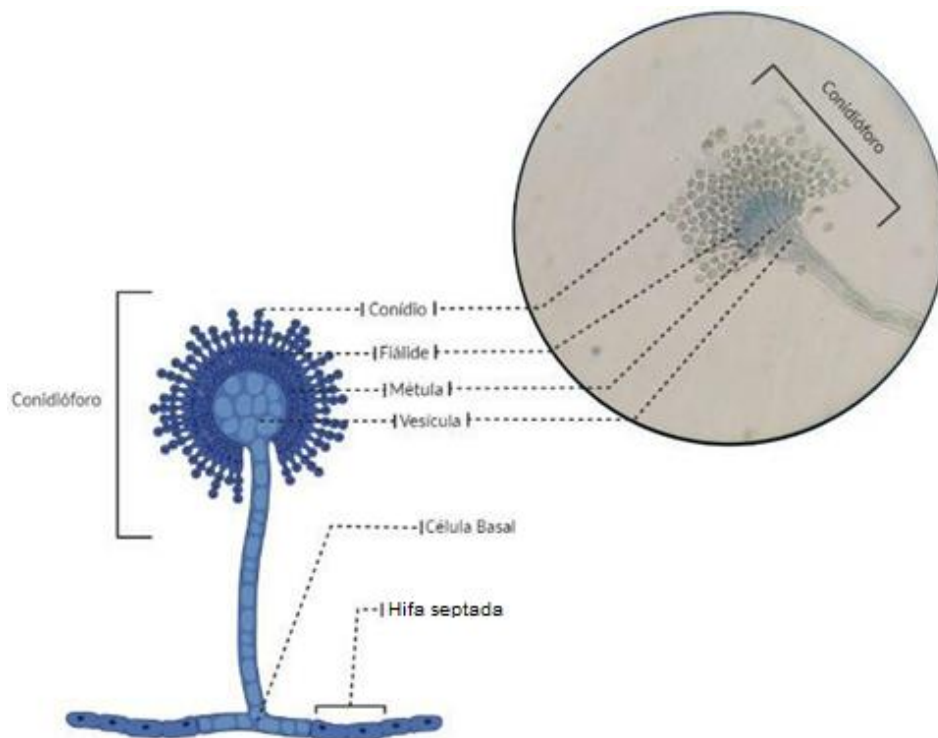
1.1. GÊNERO *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é classificado no reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales* e Família *Trichocomaceae*. Os fungos do filo *Ascomycota* possuem a característica de produzir seus esporos (ascósporos) em estruturas sexuais específicas, denominadas asco (MONEY, 2015) e a ordem *Eurotiales* apresenta fungos conhecidos como mofos verdes e azuis (HOUBRAKEN et al., 2020). As características macro e micromorfológicas dos fungos do gênero *Aspergillus* são de grande importância para a identificação das espécies. Algumas características morfológicas da colônia incluem taxas de crescimento, cor, textura, conidiação, produção de esclerócitos (massa compacta de micélio endurecido contendo reservas alimentares), cores da colônia, pigmentos solúveis no meio de cultura e os ascomas, que para este gênero são do tipo cleistotécio (corpo frutificante fechado e esférico que contém os ascos e ascósporos). Na maioria das espécies desse gênero ocorre a reprodução assexuada e sexual, e tanto as características macromorfológicas da colônia quanto às características microscópicas das estruturas reprodutivas são relevantes na identificação clássica do gênero e espécie. Essas características incluem, na reprodução assexuada, as características da estrutura de frutificação, como a cor, e dimensão do conídio, a forma da cabeça (vesícula) dos conidióforos, a presença ou ausência de métulas entre a vesícula e as fiálides (ou seja, se são unisseriadas ou bisseriadas) (figura 1) e a textura da colônia. Na reprodução sexual se observa o tamanho e morfologia dos ascos e ascósporos encontrados dentro dos cleistotécios (TSANG et al., 2018).

Inicialmente, a classificação dos fungos era baseada nos aspectos morfológicos, principalmente a morfologia das estruturas reprodutivas assexuada (conidióforos, esporóforos, hifas, entre outros) (figura 1) e assexuada (cleistotécio). Contudo, considerando que isolados clínicos de *Aspergillus* spp. podem manifestar algumas atípicas como conidiação mais lenta e formação aberrante do conidióforo, além de sobreposição de algumas características morfológicas por parte da seção *Fumigati*, este é um critério limitado de classificação taxonômica (BALAJEE et al., 2006). Dessa forma, a eficácia da caracterização do gênero pela abordagem polifásica, onde há a combinação de diversos dados e informações, sendo elas fenotípicas, moleculares (incluindo genômica, proteômica e metabólitos secundários),

genéticas e filogenéticas, para assim, atingir uma taxonomia de consenso, vêm sendo demonstrada (SAMSON, 2009).

Figura 1 – Esquema da micromorfologia das estruturas reprodutivas assexuais (conidióforo) do gênero *Aspergillus*. Fonte: Autoria própria com o auxílio do programa BioRender.

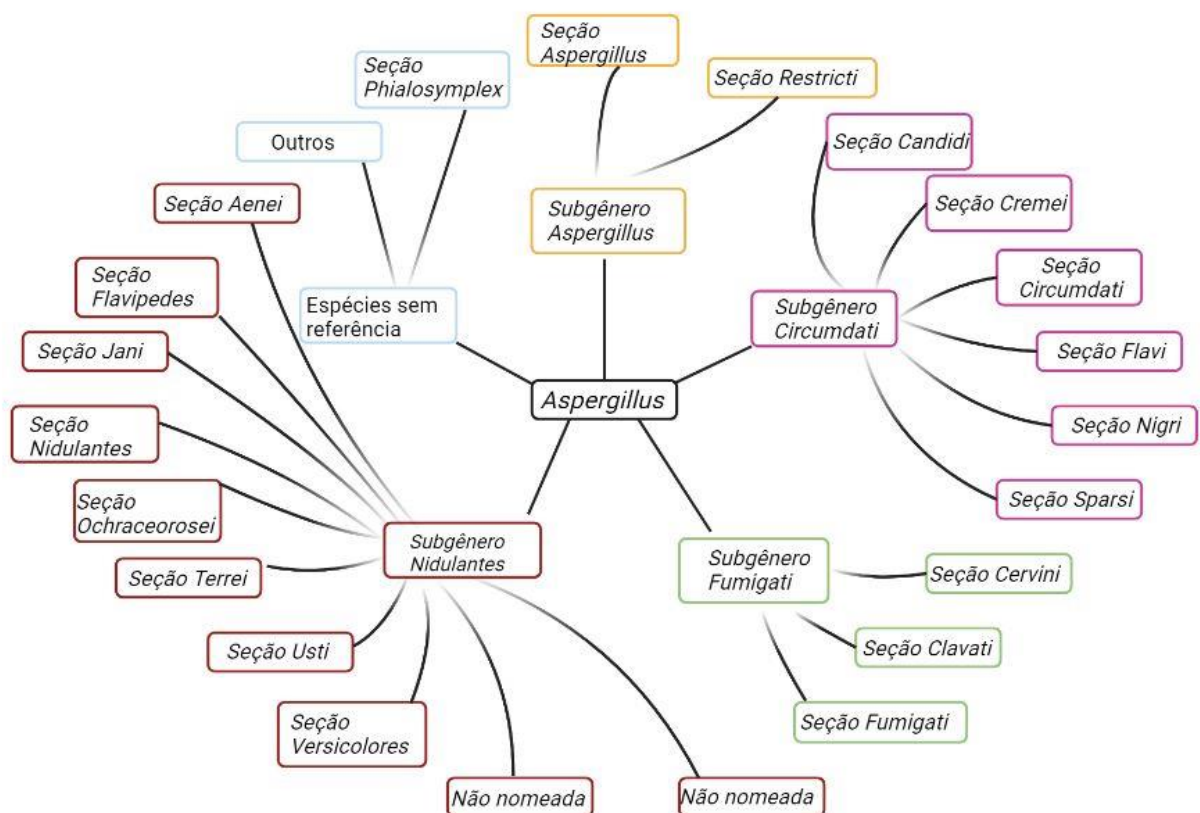


A região do DNA ribossomal (rDNA) normalmente utilizada para a identificação dos fungos é a região do espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer - ITS*). Contudo, nem sempre essa região possui variações o suficiente para distinguir as espécies. Dessa forma, um segundo marcador é necessário para identificar com maior precisão uma espécie. Esse marcador, assim como o ITS, deve fazer uso de *primers* universais, ser de fácil amplificação e, ao contrário do ITS, capaz de distinguir as espécies. Baseado nesses requisitos, os genes utilizados na identificação das espécies de *Aspergillus* são os que codificam a calmodulina (*caM*), β -tubulina (*benA*) e RNA polimerase II segunda maior subunidade (*RPB2*). Entretanto, existe a frequente dificuldade de amplificação do *RPB2* e a amplificação de muitos parálogos quando utilizado o *benA* (SAMSON et al., 2014).

O gênero *Aspergillus* era inicialmente dividido em subgêneros e grupos. Entretanto, para acompanhar as normas do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN), o gênero *Aspergillus* atualmente é dividido em subgênero e seções, sendo que, até 2019, 451

espécies já haviam sido descritas (BALAJEE et al., 2006; STEENWYK et al., 2019). Com o avanço das técnicas moleculares e a abordagem da identificação polifásica, cada vez mais espécies de *Aspergillus* têm sido estudadas e caracterizadas. Assim, os subgêneros e seções são: subgênero *Circumdati*, seções *Candidi*, *Cremei*, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* e *Sparsi*; subgênero *Aspergillus*, seções *Aspergillus* e *Restricti*; subgênero *Fumigati*, seções *Cervini*, *Clavati* e *Fumigati*; subgênero *Nidulantes*, seções *Aenei*, *Flavipedes*, *Jani*, *Nidulantes*, *Ochraceorosei*, *Terrei*, *Usti*, *Versicolores* e duas seções ainda não nomeadas onde se encontram as espécies *A. bisporus*, *A. ivorensis* e *A. raperi*. Além disso, há as espécies não referenciadas e a seção *Phialosymplex* que ainda não foi inserida em um subgênero (GAUTIER et al., 2016) (figura 2).

Figura 2: Classificação do gênero *Aspergillus* de acordo com seu subgênero e seção das espécies atualmente válidas. Fonte: Gautier et al., 2016 com modificações.



As seções *Circumdati*, *Clavati*, *Cremei*, *Nigri*, *Restricti*, *Usti* e *Versicolores* possuem espécies predominantemente isoladas do ambiente, enquanto as espécies comumente isoladas de amostras clínicas se encontram, em sua maioria, dentro das seções *Fumigati*, *Flavi* e *Terrei* (GAUTIER et al., 2016). Dentro das diversas espécies da seção *Fumigati*, *A. fumigatus* se

destaca como a causa mais comum de aspergilose invasiva nas pesquisas epidemiológicas. Entretanto, estudos recentes apontam que espécies identificadas fenotipicamente como *A. fumigatus* podem ser geneticamente distintas, levando a identificação e descrição de novas espécies (BALAJEE et al., 2006). Assim, além de *A. fumigatus sensu stricto*, as novas espécies que são associadas às infecções fúngicas são *A. novofumigatus*, *A. hiratsukae*, *A. viridinutans*, *A. lentulus* e *A. udagawae*, tendo os dois últimos apresentado (*in vitro*) baixa sensibilidade aos antifúngicos utilizados no tratamento da aspergilose invasiva (BALAJEE et al., 2006; ALCAZAR-FUOLI et al., 2008; ESCRIBANO et al., 2013). Dentro das diversas espécies da seção *Flavi*, há duas espécies de relevância clínica: *A. parasiticus* e *A. flavus*, sendo o último, ao lado de *A. fumigatus* a segunda maior causa de aspergilose invasiva e não-invasiva em seres humanos. Além disso, as seis espécies que possuem importância econômica são, além de *A. flavus* e *A. parasiticus*, também *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. tamaritii*. Os fungos da seção *Flavi* produzem uma gama de aflatoxinas e agentes cancerígenos naturais (GODET, MUNAUT, 2010; DENNING et al., 2003; HEDAYATI et al., 2007). Dentro da seção *Terrei*, existem espécies de relevância clínica devido a sua resistência intrínseca aos antifúngicos comerciais, em destaque a *A. terreus*, que possui baixa sensibilidade *in vivo* e *in vitro* à Anfotericina B, além disso, alguns estudos vêm apresentando um perfil de linhagem não selvagem de amostras clínicas de *A. terreus* para os azóis (ZORAN et al., 2018; GAUTIER et al., 2016).

Embora a maioria das espécies dentro de *Aspergillus* seção *Nigri* sejam isolados ambientais, há algumas espécies dentro da seção, *A. niger* e *A. tubingensis*, que são frequentemente encontrados, junto com *A. flavus*, entre os isolados clínicos de otomicose (otite externa fúngica) e de amostras de nasofaringe (MOUSSALLE et al., 1999).

1.2. A ASPERGILOSE, O TRATAMENTO ANTIFÚNGICO E A RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

A aspergilose (infecção por *Aspergillus*) é uma doença multiforme, onde as manifestações clínicas podem se apresentar da forma alérgica, crônica ou invasiva, as quais são determinadas pela resposta imune do hospedeiro (SALES, 2009; TSANG et al., 2018). Assim, embora seja comum a exposição e inalação de conídios de *Aspergillus* spp., existe uma pequena parcela da população que desenvolve um quadro de aspergilose, sendo eles os imunossuprimidos ou imunocomprometidos. A doença envolve diversas apresentações clínicas, incluindo aspergiloma (ou bola fúngica) no pulmão e nos seios nasais e paranasais, exacerbação

da asma e asma grave com sensibilização fúngica, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), otomicose, onicomicose, ceratite, endoftalmite, infecções cutâneas e de feridas, infecções osteoarticulares, aspergilose pulmonar crônica, sinusite crônica invasiva e granulomatosa, bronquite e traqueobronquite invasiva e aspergilose pulmonar invasiva (API) (GAUTIER et al., 2016).

A linha de defesa principal contra conídios inalados de *Aspergillus* spp. são os macrófagos, além disso, receptores de reconhecimento de patógenos trabalham identificando componentes específicos da parede fúngica e produzem citocinas que atuam estimulando o recrutamento de neutrófilos, que são o principal mecanismo de defesa contra hifas. Dessa forma, pode-se concluir que a aspergilose invasiva normalmente acomete pacientes imunossuprimidos ou com alguma deficiência imune, como pacientes em quadro de neutropenia, recém transplantados ou em tratamento prolongado de altas doses de corticosteroides (KOUSHA et al., 2011).

A API é caracterizada por uma infecção similar à pneumonia bacteriana, de rápida progressão, onde o patógeno invade o parênquima pulmonar e tende a penetrar os vasos sanguíneos e disseminar pelo hospedeiro (MILLER, 1996). A ABPA é a forma alérgica da doença onde o paciente apresenta hipersensibilidade aos antígenos de *Aspergillus* spp., principalmente de *A. fumigatus*. A patogenia da ABPA não é totalmente conhecida, embora a maioria dos casos ocorram entre pacientes com doenças pulmonares como asma ou fibrose cística. O diagnóstico é dado através de testes sorológicos e radiológicos, sendo os sinais da doença o espessamento da parede brônquica. O tratamento é feito com a administração oral de corticosteroides, que atuam reduzindo a hipersensibilidade à resposta inflamatória provocada pelo patógeno. Alguns estudos têm sido realizados utilizando itraconazol e voriconazol no tratamento de ABPA e vêm apresentando resultados promissores. Contudo, o itraconazol em alguns casos pode atuar potencializando os corticosteroides, o que pode levar a uma anomalia do hormônio adrenocorticotrófico e insuficiência adrenal. Além da ABPA outras doenças que podem ser causadas por reações alérgicas a *Aspergillus* são pneumonia de hipersensibilidade e granulomatose broncocêntrica (KOUSHA et al., 2011; MILLER, 1996; JUDSON, 2004; SKOV et al., 2002).

Existem poucas classes de antifúngicos utilizadas no tratamento das infecções fúngicas, entre elas estão os azóis, polienos, derivados pirimidínicos e equinocandinas. Os antifúngicos da classe dos azóis agem inibindo a enzima 14 α -esterol desmetilase, membro da família do

citocromo P450 codificado pelo gene *cyp51A*, que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol – componente da membrana celular fúngica. Assim, os azóis agem interferindo na biossíntese de ergosterol na membrana fúngica, alterando dessa maneira a estrutura e funções da membrana e, por consequência, inibindo o desenvolvimento do fungo. A ligação do átomo de nitrogênio do anel triazólico de cinco membros ao átomo de ferro do grupo heme presente no sítio ativo da proteína CYP51A inibe a etapa de desmetilação, resultando no bloqueio da síntese de ergosterol. Esta classe é representada pelos triazóis itraconazol (ITR), voriconazol (VOR) e posaconazol (POS). Espécies do gênero *Aspergillus* possuem duas isoenzimas CYP51A e CYP51B e, embora a codificação desses genes não seja essencial para o crescimento celular, a inativação concomitante de ambos pode ser letal ao microrganismo. O uso indiscriminado na agricultura de antifúngicos da classe dos azóis, combinado com a atividade fungistática em baixa dose e o uso excessivo e prolongado de azóis aumentaram a porcentagem de cepas de fungos resistentes (HARGROVE *et al.*, 2015; ZAKARIA *et al.*, 2020).

A classe dos polienos é representada pela Anfotericina B (AMB), que é um agente antimicótico de amplo espectro utilizado em infecções sistêmicas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Candida*, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Pesquisas apontam que a AMB é uma droga que age na membrana formando estruturas semelhantes a canais (poros) que atravessam a bicamada lipídica. É cónito que essa droga se liga ao ergosterol na parede celular da membrana e, acredita-se que durante o processo de auto oxidação da AMB, seus efeitos antifúngicos resultam em dano oxidativo. Contudo, a utilização da AMB deve ser limitada devido à sua nefrotoxicidade, que pode resultar em insuficiência renal (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011; SOKOL-ANDERSON *et al.*, 1986; POSCH *et al.*, 2018).

A Flucitosina ou 5-fluorocitosina (5-FC) é um análogo fluorado da citosina que é usado como agente antifúngico para o tratamento de infecções graves, é uma droga da classe dos derivados pirimidínicos e, muitas vezes, é administrada em conjunto com a AMB, pois sua ação conjunta potencializa os efeitos da AMB, resultando numa diminuição da dosagem e redução dos efeitos colaterais. A 5-FC atua diretamente sobre os organismos fúngicos, por inibição competitiva de absorção de purina e pirimidina e indiretamente pelo metabolismo intracelular. Após a absorção pela citosina permease, a 5-FC sofre um processo de desaminação e é convertida em 5-fluorouracil (5-FU). O 5-FU pode passar por dois processos distintos dentro da célula fúngica: ele pode ser convertido em trifosfato de 5-fluorouridina, composto que será

incorporado ao RNA fúngico e agirá inibindo a síntese proteica; ou pode ser metabolizado e convertido em 5-fluorodesoxiuridina monofosfato, composto que age inibindo a fonte primária de timidina na biossíntese do DNA. Esse antifúngico é amplamente utilizado no tratamento de micoses sistêmicas, uma vez que não há grande taxa de conversão de flucitosina em 5-fluorouracil, permitindo uma alta absorção da droga pelo organismo e distribuição por todo o corpo (SANDE & MANDELL, 1987; SIDRIM & MOREIRA, 1999; HOULN, SPÍŽEK & HAVLÍČEK, 2020).

Os antifúngicos da classe das equinocandinas atuam inibindo a síntese de β -1,3-Glucana, resultando num desequilíbrio osmótico que leva a morte do organismo. As drogas dessa classe agem em uma gama de fungos e leveduras e possuem baixa incidência de efeitos colaterais. Estão dentro dessa classe a Caspofungina, a Anidufungina e a Micafungina, sendo a primeira amplamente utilizada no tratamento da API (DERESINSKI & STEVENS, 2003; DIEKEMA et al., 2003).

A maioria dos medicamentos para o tratamento das infecções fúngicas são fungistáticos, ou seja, agem inibindo o crescimento do fungo. Dessa forma, o tratamento das infecções fúngicas é demorado e demonstra menor eficácia em indivíduos imunocomprometidos (PATTERSON & STREK, 2016). O tratamento das infecções por *Aspergillus* spp. varia de acordo o tipo de infecção causada pelo microrganismo, por exemplo, nos casos de ABPA o tratamento é realizado pela associação de corticosteróide e ITR. Já nos casos de API o tratamento de primeira escolha é o VOR. Em casos da contraindicação do VOR, a administração da AMB lipossomal é recomendada. Acredita-se que a formulação lipídica da AMB lipossomal é mais efetiva e menos tóxica do que a AMB convencional (PATTERSON et al., 2016).

Os antifúngicos comerciais apresentam o mecanismo de ação com único sítio alvo (*e.g.* 14 α -esterol desmetilase, ergosterol, β -1,3-Glucana sintase). Portanto, existe a maior probabilidade de desenvolvimento de linhagens fúngicas resistentes ao tratamento, como mostrado por diversos estudos em que espécies fúngicas estão desenvolvendo resistência a esses grupos de antifúngicos (MELLADO et al., 2001; MELLADO et al., 2005; SNELDERS et al., 2010; MELLADO et al., 2007; CHOWDHARY et al., 2011). Considerando *Aspergillus* spp., observou-se casos de resistência principalmente contra antifúngicos do grupo dos azóis e algumas equinocandinas (SATISH et al., 2019). A resistência aos antifúngicos pode ser definida de duas maneiras, microbiológica e clínica. A resistência microbiológica ocorre quando a concentração do antimicrobiano usado contra o patógeno é maior do que o utilizado contra uma

linhagem selvagem. Já a resistência clínica é definida quando a concentração do antifúngico a ser utilizado para inibir/matar o fungo é maior do que a considerada segura ao paciente (PFALLER, 2012).

1.2.1. Mecanismo de resistência aos azóis mediado pelo promotor e gene *cyp51A*

A resistência aos antifúngicos azólicos está associada às inserções de sequência de repetição em tandem (*Tandem Repeats*, TR) na região promotora do gene *cyp51A* e às mutações neste próprio gene. As alterações na região promotora do gene *cyp51A* relacionadas à resistência do fungo aos antifúngicos são mediadas pelas TR os quais são 34 pb, 46 pb e 53 pb *upstream* (a montante) do gene *cyp51A* (DUDAKOVA et al., 2017). Em estudos de vigilância epidemiológica, a TR34 é especialmente responsável por até 70% das alterações associadas à resistência (ZHANG et al., 2020). As mutações presentes no gene *cyp51A* – alvo do mecanismo de ação dos azóis e codificador da enzima 14 α -esterol desmetilase - estão associadas à resistência a estes antifúngicos e presentes em diversos isolados clínicos, incluindo em espécies do gênero *Aspergillus*. Dependendo do tipo de mutação e sua localização na sequência genética, a cepa resultante pode exibir uma variedade de fenótipos de resistência, abrangendo um espectro de suscetibilidades aos azóis, incluindo a resistência a um único ou a diversos antifúngicos desta classe ao mesmo tempo (NYWENING et al., 2020). As mutações pontuais no gene *cyp51A* são geralmente relatadas em isolados clínicos de pacientes que recebem terapia azólica de longo prazo (geralmente mais de 4 meses), particularmente no caso de aspergilose crônica. Contudo, essas mutações vêm sendo observadas com mais frequência nos últimos tempos. Algumas mutações, como substituições de aminoácidos únicos na glicina 54 (G54V, G54E, G54R, G54W) e 138 (G138C) da proteína CYP51A causam uma resistência cruzada ao ITR e POS. Outras mutações, como G448S, reduzem a atividade do CYP51A e induzem a resistência ao VOR. A substituição na metionina (M) 220 (M220I, M220V, M220T, M220K) está relacionada a vários padrões de suscetibilidade reduzida aos azóis. As mutações pontuais, como A284T, F219C, F219I, G434C, G432S, H285Y, P216L e Y431C, também foram encontradas esporadicamente (DUDAKOVA et al., 2017; SPIESS et al., 2014; BUEID et al., 2010; CHOWDHARY et al., 2011).

O alelo de resistência mais frequentemente observado em *A. fumigatus* consiste em uma TR de 34 pb (TR34) na região promotora combinada com a substituição L98H da CYP51A (TR34/L98H). Esta combinação foi detectada várias vezes e associada a um aumento de até 8 vezes na expressão do gene. Da mesma forma, a mutação TR46/Y121F/T289A é um

mecanismo de resistência emergente com alto nível de resistência ao VOR e CIMs (Concentração Inibitória Mínima) elevados para todos os outros azóis. Além disso, uma sequência de repetição em tandem de 53 pb também foi detectada na região promotora do *cyp51A* sem qualquer substituição de aminoácidos no gene. Essa mutação confere um perfil de resistência do fungo ao ITR e VOR e baixa suscetibilidade ao POS (HARGROVE *et al.*, 2015; DIAZ-GUERRA *et al.*, 2003; DUDAKOVA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020).

1.2.2. Resistência aos azóis não mediada por *cyp51A*

É importante apontar que nem todos os isolados que demonstram baixa/nenhuma sensibilidade aos antifúngicos azólicos terão alteração na região promotora e mutações no gene *cyp51A*. Os mecanismos de resistência comumente reconhecidos incluem ocorrências genéticas e epigenéticas, como alterações nos componentes do fator de transcrição, alteração da via biossintética de esterol, superexpressão de bombas de efluxo de drogas específicas ou outros meios pelos quais o acúmulo intracelular dos azóis é reduzido nas células fúngicas. Alterações genéticas que não estão dentro das sequências ou regiões promotoras do *cyp51A* foram encontradas e associadas de forma convincente à resistência aos antifúngicos e nas falhas de tratamento em pacientes (NYWENING *et al.*, 2020).

Um repressor transcripcional do *cyp51A*, o fator de transcrição de ligação CCAAT fúngico (*CCAAT binding complex*, CBC) conhecido como HapE quando alterado com uma única mutação confere o fenótipo de resistência a diversos antifúngicos azólicos ao mesmo tempo (CAMPS *et al.*, 2012a; GSALLER *et al.*, 2016b). Outro mecanismo de resistência aos azóis é a superexpressão de bombas de efluxo associadas à extrusão de moléculas antimicrobianas, incluindo os azóis. Os transportadores *ATP-Binding Cassete* (ABC) e as classes da superfamília facilitadora principal (*major facilitator superfamily* – MFS) são considerados os dois principais tipos de bombas de efluxo com relevância clínica em diversos fungos patogênicos. O gene de codificação da bomba de efluxo de *A. fumigatus*, *cdr1B*, também conhecido como *abcB*, *abcC* ou *abcG1*, codifica um transportador ABC e está associado à resistência ao ITR (NYWENING *et al.*, 2020). A instabilidade genética pode resultar em alterações de ploidia, rearranjo cromossômico e mutações no código genético. Mutações ou ruptura de genes que codificam elementos de danos ao DNA e vias de pontos de checagem do ciclo celular afetam a estabilidade genômica e a suscetibilidade aos azóis. Por exemplo, a deleção dos genes que codificam as quinases AtmA e AtrA, que estão envolvidos na resposta ao dano ao DNA e ativação de vias de reparo de DNA e pontos de checagem do ciclo celular,

aumentam a adaptabilidade ao estresse causado pelos azóis a níveis mais altos do que uma linhagem do mesmo fungo do tipo selvagem (DOS REIS et al., 2018).

1.3. BIOFILME MICROBIANO

Os biofilmes microbianos são populações de células associadas e incorporadas a uma matriz extracelular produzida pelo próprio microrganismo. Existem diversos gêneros de fungos causadores de infecções em que a patogenicidade está relacionada à produção de biofilme. Entre eles estão: *Candida*, *Coccidioides*, *Aspergillus*, *Malassezia*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* (RAMAGE et al., 2012; FANNING; MITCHELL, 2012).

Entre as vantagens da formação de biofilme estão a resistência a choques mecânicos e estresse químico, proteção contra o ambiente e aumento da resistência aos antimicrobianos. Na literatura há evidências que comprovam que os fungos do gênero *Aspergillus* possuem alta capacidade de formação de biofilme, o que resulta em um maior índice de infecções e maior resistência aos antifúngicos (ZHANG et al., 2021; RAMAGE et al., 2012). De acordo com Kaur e Singh (2014), estudos feitos em pacientes infectados por *Aspergillus* sp. reportam que o índice de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (principalmente pacientes com câncer e que apresentam neutropenia) é alto devido à alta capacidade de produção de biofilme e a consequente resistência aos antimicrobianos.

O processo de formação de biofilme é gradativo, sendo que biofilmes jovens são mais suscetíveis aos antifúngicos que os biofilmes maduros. Estudos recentes mostram que esse fenômeno se dá pelo fato de que a atividade de efluxo do antifúngico aumenta de acordo com a maturação do biofilme. Sendo assim, a formação do biofilme está diretamente relacionada à resistência microbiana (RAMAGE et al., 2012).

1.4. O MODELO ANIMAL ALTERNATIVO *Galleria mellonella*

Devido ao custo elevado e à dificuldade de manutenção nos últimos tempos, vêm-se observando a necessidade de redução da utilização de modelos vertebrados para testes *in vivo* de toxicidade e virulência. Dessa forma, modelos alternativos como *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* e *Manduca sexta* vem sendo utilizados em diversas pesquisas de virulência e toxicidade para microrganismos e agentes antimicrobianos (KAVANAGH; FALLON, 2010). Diversas pesquisas vêm demonstrando que insetos podem ser utilizados para avaliar a patogenicidade microbiana e fornecer resultados comparáveis aos

obtidos com mamíferos, uma vez que a resposta imune inata de vertebrados permanece semelhante à resposta imune encontrada em insetos (LAVINE; STRAND, 2002; KAVANAGH; REEVES, 2004; WITTWER *et al.*, 1999; RENWICK *et al.*, 2007; BRENNAN *et al.*, 2002). As larvas da cera de abelha *Galleria mellonella* têm sido usadas para avaliar a virulência de uma variedade de patógenos bacterianos e fúngicos. A correlação com o perfil de virulência desses microrganismos em *G. mellonella* foi observado em camundongos (FUCHS; MYLONAKIS, 2006). Concomitante à fácil manutenção, a utilização de *G. mellonella* como modelo *in vivo* traz benefícios pois oferece a possibilidade de ser mantido em diversas temperaturas, variando de 25 °C a 37 °C, possibilitando o estudo de características do patógeno relacionadas à temperatura. Além disso, o modelo *G. mellonella* permite uma fácil inoculação das células fúngicas, o que é vantajoso uma vez que a inoculação por injeção permite um maior controle da concentração de células fúngicas inoculadas, possibilitando resultados mais precisos e satisfatórios (FUCHS; MYLONAKIS, 2006).

2. CONCLUSÕES

- 80% dos isolados clínicos foram identificados como *A. fumigatus sensu stricto* e 20% como *A. flavus*;
- 68,6% dos isolados clínicos deste estudo apresentaram perfil não selvagem para a AMB;
- A porcentagem de isolados clínicos do tipo não selvagem para POS analisados em nosso estudo (58%; n=30/51) é elevada em relação aos países europeus;
- As linhagens não selvagens para ITR são pouco frequente na nossa região, o que difere da maior prevalência na Europa;
- Foi encontrada baixa porcentagem de isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto* não selvagem ao VOR;
- Não foram encontradas TR na região promotora do gene *cyp51A* e 46,3% (n=19/41) dos isolados apresentaram mutações no gene *cyp51A*, sendo as alterações F46Y, G89G, M172V, N248T, N248K, D255E, L358L, C454C;
- Apesar dos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto* não apresentarem TR na região promotora e apresentarem alterações de aminoácidos com baixa relevância para a resistência do microrganismo aos azóis, existem indícios de que na nossa amostragem estas alterações tenham influenciado nas altas CIMs destes antifúngicos;
- Os isolados clínicos de *A. flavus* apresentaram maior produção de biofilme e maior virulência em *G. mellonella*, em comparação com *A. fumigatus sensu stricto* deste estudo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCAZAR-FUOLI, Laura; MELLADO, Emilia; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana; CUENCA-ESTRELLA, Manuel; RODRIGUEZ-TUDELA, Juan L.. Aspergillus Section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 1244-1251, 22 jan. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00942-07>.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

A. ESPINEL-INGROFF, M. CUENCA-ESTRELLA, A. FOTHERGILL, J. FULLER, M. GHANNOUM, E. JOHNSON, T. PELAEZ, M. A. PFALLER, J. TURNIDGE. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B and Aspergillus spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Oct 2011, 55 (11) 5150-5154; DOI: 10.1128/AAC.00686-11

BALAJEE, S. Arunmozhi; NICKLE, David; VARGA, Janos; MARR, Kieren A.. Molecular Studies Reveal Frequent Misidentification of Aspergillus fumigatus by Morphotyping. **Eukaryotic Cell**, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 1705-1712, out. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.00162-06>.

BINDER, R *et al.* Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity. **Medicine Baltimore**, [s. l], v. 61, n. 2, p. 109-124, mar. 1982. Doi: 10.1097/00005792-198203000-00005.

Binder U, Elisabeth Maurer, Cornelia Lass-Flörl, Galleria mellonella: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species, *Fungal Biology*, Volume 120, Issue 2, 2016, Pages 288-295, ISSN 1878-6146, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.002>.

BLUM G, Perkhofer S, Haas H, et al. Potential basis for amphotericin B resistance in Aspergillus terreus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1553–1555.

BRENNAN, Marc; THOMAS, David Y.; WHITEWAY, Malcolm; KAVANAGH, Kevin. Correlation between virulence of Candida albicans mutants in mice and Galleria mellonella larvae. *Fems Immunology & Medical Microbiology*, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 153-157, out. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2002.tb00617.x>.

BUEID, A.; HOWARD, S. J.; MOORE, C. B.; RICHARDSON, M. D.; HARRISON, E.; BOWYER, P.; DENNING, D. W.. Azole antifungal resistance in Aspergillus fumigatus: 2008 and 2009. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, [S.L.], v. 65, n. 10, p. 2116-2118, 20 ago. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq279>.

Camps, S.M., Dutilh, B.E., Arendrup, M.C., Rijs, A.J., Snelders, E., Huynen, M.A., et al. (2012) Discovery of a HapE mutation that causes azole resistance in Aspergillus fumigatus through whole genome sequencing and sexual crossing. *PLoS One* 7: e50034.

CHATTOPADHYAY, Amitabha; JAFURULLA, Md.. A novel mechanism for an old drug: amphotericin b in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [S.L.], v. 416, n. 1-2, p. 7-12, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.023>.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 2nd ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, Approved standard M38-A, 2008.

CLSI. Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing, 2nd ed. CLSI supplement M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

CHEN, P.; LIU, J.; ZENG, M.; SANG, H.. Exploring the molecular mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Journal de Mycologie Médicale*, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 1-5, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100915>.

CHOWDHARY, A.; KATHURIA, S.; RANDHAWA, H. S.; GAUR, S. N.; KLAASSEN, C. H.; MEIS, J. F.. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, [S.L.], v. 67, n. 2, p. 362-366, 25 out. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr443>.

DAVIS, Dana A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. **Current Opinion in Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 365-370, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.006>.

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, jul. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00055-08>.

de HOOG, G.S., J. Guarro, J. Gene and M.J. Figueras. 2015. Atlas of Clinical Fungi (Version 4.1.2). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands

DENNING, David W.; RINIOTIS, Kostantinos; DOBRASHIAN, Richard; SAMBATAKOU, Helen. Chronic Cavitory and Fibrosing Pulmonary and Pleural Aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 265-280, out. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/376526>.

Denning DWPS, Lass-Flörl C, Fraczek MG, Kirwan M, Gore R, et al. High-frequency triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin Infect Dis*. 2011;52(9):1123–9.

DENNING, D.; Cadranel, J.; Beigelman-Aubry, C.; Ader, F.; Chakrabarti, A.; Blot, S.; Ullmann, A.J.; Dimopoulos, G.; Lange, C.; on behalf of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases and European Respiratory Society. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur. Respir. J*. 2016, 47, 45–68.

DERESINSKI SC, Stevens DA. Caspofungin. Clin Infect Dis. 2003 Jun 1;36(11):1445-57. doi: 10.1086/375080. Epub 2003 May 19. PMID: 12766841.

DIAZ-GUERRA, T. M. *et al.* A Point Mutation in the 14 α -Sterol Demethylase Gene *cyp51A* Contributes to Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 47, n. 3, p. 1120-1124, mar. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.47.3.1120-1124.2003>.

DIEKEMA DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. J Clin Microbiol. 2003 Aug;41(8):3623-6. doi: 10.1128/JCM.41.8.3623-3626.2003. PMID: 12904365; PMCID: PMC179829.

DHINGRA, Sourabh; CRAMER, Robert A.. Regulation of Sterol Biosynthesis in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: opportunities for therapeutic development. Frontiers In Microbiology, [S.L.], v. 8, n. 92, p. 1-14, 1 fev. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00092>.

Dos Reis, T.F., Silva, L.P., de Castro, P.A., de Lima, P.B.A., do Carmo, R.A., Marini, M.M., et al. (2018) The influence of genetic stability on *Aspergillus fumigatus* virulence and azole resistance. G3 (Bethesda) 8: 265–278.

DUDAKOVA, Anna *et al.* Molecular Tools for the Detection and Deduction of Azole Antifungal Drug Resistance Phenotypes in *Aspergillus* Species. **Asm Journals**, [S.I.], v. 30, n. 4, p. 1-21, set. 2017

DURIEUX, Marie-Fleur; MELLOUL, Élise; JEMEL, Sana; ROISIN, Lolita; DARDÉ, Marie-Laure; GUILLOT, Jacques; DANNAOUI, Éric; BOTTEREL, Françoise. *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. Virulence, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 818-834, 8 mar. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2021.1893945>.

EL-HOUSSAINI, Houdaii H.; ELNABAWY, Omnia M.; NASSER, Hebatallah A.; ELKHATIB, Walid F.. Influence of subinhibitory antifungal concentrations on extracellular hydrolases and biofilm production by *Candida albicans* recovered from Egyptian patients. BMC Infectious Diseases, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-9, 16 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-019-3685-0>.

ESCRIBANO, Pilar; PELÁEZ, Teresa; MUÑOZ, Patricia; BOUZA, Emilio; GUINEA, Jesús. Is Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* a Problem in Spain? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 57, n. 6, p. 2815-2820, 29 abr. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02487-12>.

ESPINEL-INGROFF *et al.* 2018. Posaconazole MIC distributions for *Aspergillus fumigatus* species complex by four methods: impact of *cyp51A* mutations on estimation of epidemiological cutoff values. Antimicrob Agents Chemother 62:e01916-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01916-17>.

FANNING, Saranna; MITCHELL, Aaron P.; Fungal Biofilms. **Plos Pathog**, [S.I.], v. 8, n. 4, p. 1-4, maio 2012.

FUCHS, Beth Burgwyn; MYLONAKIS, Eleftherios. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Current Opinion In Microbiology*, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 346-351, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.004>.

GAUTIER, M., et al. "Previously Unknown Species of *Aspergillus*". *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 22, no 8, agosto de 2016, p. 662–69. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.013>.

GHORBEL, D.; HADRICH, I.; NEJI, S.; TRABELSI, H.; BELAAJ, H.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; MAKNI, F.; AYADI, A.. Detection of virulence factors and antifungal susceptibility of human and avian *Aspergillus flavus* isolates. **Journal de Mycologie Médicale**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 292-302, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100900>.

GODET, Marie; MUNAUT, Françoise. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section Flavi. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 304, n. 2, p. 157-168, mar. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01890.x>.

GONÇALVES SS, Stchigel AM, Cano J, Guarro J, Colombo AL. In vitro anti-fungal susceptibility of clinically relevant species belonging to *Aspergillus* section Flavi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1944–1947.

Gsaller, F., Hortschansky, P., Furukawa, T., Carr, P.D., Rash, B., Capilla, J., et al. (2016b) Sterol biosynthesis and azole tolerance is governed by the opposing actions of SrbA and the CCAAT binding complex. *PLoS Pathog* 12: e1005775.

HARGROVE, Tatiana Y. *et al.* Structure-Functional Characterization of Cytochrome P450 Sterol 14 α -Demethylase (CYP51B) from *Aspergillus fumigatus* and Molecular Basis for the Development of Antifungal Drugs. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.I.], v. 290, n. 39, p. 1-19, set. 2015.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W.. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, [S.L.], v. 153, n. 6, p. 1677-1692, 1 jun. 2007. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/007641-0>.

HINSON, K. F. W. *et al.* Broncho-pulmonary Aspergillosis - A Review and a Report of Eight New Cases. **Thorax**, [S.I.], v. 7, n. 4, p. 317-333, dez. 1952.

HOULŇ, Jiří; SPÍŽEK, Jaroslav; HAVLÍČEK, Vladimír. Antifungal Drugs. Metabolites, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 106, 12 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo10030106>.

J. HOUBRAKEN, S. Kocsubé, C.M. Visagie, N. Yilmaz, X.-C. Wang, M. Meijer, B. Kraak, V. Hubka, K. Bensch, R.A. Samson, J.C. Frisvad, Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species, *Studies in Mycology*, Volume 95, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>.

JUDSON MA. Noninvasive Aspergillus pulmonary disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 2004 Apr;25(2):203-19. doi: 10.1055/s-2004-824904. PMID: 16088463.

JUNGHANS H., Metzloff M. (1990) A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. *Biotechniques* 2: 176

KAUR, Savneet; SINGH, Shweta. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, [S.I.], v. 52, n. 1, p. 2-9, jan. 2014.

KAVANAGH, Kevin; FALLON, John P.. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews*, [S.L.], v. 24, n. 1-2, p. 79-83, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2010.04.001>.

KOICHIRO Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipinski, Sudhir Kumar, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 30, Issue 12, December 2013, Pages 2725–2729, <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

KOUSHA M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011 Sep 1;20(121):156-74. doi: 10.1183/09059180.00001011. PMID: 21881144.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; LI, Michael; KNYAZ, Christina; TAMURA, Koichiro. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology And Evolution**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1547-1549, jun. 2018.

LAMOTH, Frédéric. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-8, 17 maio 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00683>.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R.. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, [S.L.], v. 32, n. 10, p. 1295-1309, out. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0965-1748\(02\)00092-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0965-1748(02)00092-9).

LI, Li; YANG, Hong-Jun; LIU, Dai -Cheng; HE, Hong-Bin; WANG, Chang-Fa; ZHONG, Ji-Feng; GAO, Yun-Dong; ZENG, Yanjun. Analysis of biofilm formation and associated gene detection in *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis. *African Journal of Biotechnology*, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 2113-2118, 26 jan. 2012. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb11.081>.

LI et al. Disruption of the phospholipase D gene attenuates the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*. n.1, v. 80, p. 429-440, 2012.

LI, Yeqi; ZHANG, Yuanwei; LU, Ling. Calcium signaling pathway is involved in non-CYP51 azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, [S.L.], v. 57, n. 2, p. 233-238, 28 fev. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy075>.

MAURER, Elisabeth; BROWNE, Niall; SURLIS, Carla; JUKIC, Emina; MOSER, Patrizia; KAVANAGH, Kevin; LASS-FLÖRL, Cornelia; BINDER, Ulrike. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. *Virulence*, [S.L.], v.

6, n. 6, p. 591-598, 24 jun. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2015.1045183>.

MELLADO, E.; DIAZ-GUERRA, T. M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.. Identification of Two Different 14- α Sterol Demethylase-Related Genes (cyp51A and cyp51B) in *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* species. *Journal Of Clinical Microbiology*, [S.L.], v. 39, n. 7, p. 2431-2438, jul. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.39.7.2431-2438.2001>.

MELLADO, E., G. Garcia-Effron, et al. "Targeted Gene Disruption of the 14- α Sterol Demethylase (Cyp51A) in *Aspergillus Fumigatus* and Its Role in Azole Drug Susceptibility". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, junho de 2005. world, *journals.asm.org*, <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2536-2538.2005>.

MELLADO, E., G. Garcia-Effron, L. Alcázar-Fuoli, et al. "A New *Aspergillus Fumigatus* Resistance Mechanism Conferring In Vitro Cross-Resistance to Azole Antifungals Involves a Combination of Cyp51A Alterations". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, junho de 2007. world, *journals.asm.org*, <https://doi.org/10.1128/AAC.01092-06>.

MEZHER MA, Raoof WM, Bandar KI. Identification study some virulence factors of invasive mold infections isolated from patients undergoing chemotherapy in Tikrit teaching Hospital. *Egypt Acad J Biolog Sci*. 2015;7(1):1–11.

MILLER WT. Aspergillosis: a disease with many faces. *Semin Roentgenol*. 1996 Jan;31(1):52-66. doi: 10.1016/s0037-198x(96)80040-x. PMID: 8838945.

MONEY, NP. Chapter 1 - Fungal Diversity. In: WATKINSON, Sarah C.; BODDY, Lynne; MONEY, Nicholas P.. **The Fungi**. 3. ed. Ohio: Elsevier, 2015. Cap. 1. p. 1-36.

MOUSSALLE, Sérgio Kalil et al. Revisão: Otite externa fúngica. *International Archives Of Otorhinolaryngology*, Porto Alegre, v. 3, n. 4, p. 193-195, nov. 1999.

MOYE-ROWLEY WS. 2015. Multiple mechanisms contribute to the development of clinically significant azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol* 6:70. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00070>.

NYWENING, Ashley V.; RYBAK, Jeffrey M.; ROGERS, Phillip David; FORTWENDEL, Jarrod R.. Mechanisms of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. ***Environmental Microbiology***, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 4934-4952, 21 out. 2020. Wiley. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15274>

PASQUALOTTO, Alessandro C.; POWELL, Georgina; NIVEN, Robert; DENNING, David W.. The effects of antifungal therapy on severe asthma with fungal sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Respirology*, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1121-1127, nov. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01640.x>.

PATTERSON, Karen C.; STREK, Mary E.; Diagnosis and Treatment of Pulmonary Aspergillosis Syndromes. ***Chest***, Pennsylvania, v. 5, n. 146, p. 1358-1368, jun. 2016.

PATTERSON, Thomas F.; THOMPSON, George R.; DENNING, David W.; FISHMAN, Jay A.; HADLEY, Susan; HERBRECHT, Raoul; KONTOYIANNIS, Dimitrios P.; MARR, Kieren A.; MORRISON, Vicki A.; NGUYEN, M. Hong. 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. 1-60, 29 jun. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw326>.

PÉREZ-CANTERO, Alba *et al.* Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, Terragona, v. 55, n. 1, p. 1-11, set. 2019.

PFALLER, Michael A.. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal Of Medicine**, [s. l], v. 125, n. 1, p. 3-13, jan. 2012.

PHAM, C.D.; Reiss, E.; Hagen, F.; Meis, J.F.; Lockhart, S.R. Passive surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014, 20, 1498–1503

POSCH, Wilfried, et al. “*Aspergillus Terreus*: Novel Lessons Learned on Amphotericin B Resistance”. *Medical Mycology*, vol. 56, n° suppl_1, abril de 2018, p. S73–82. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1093/mmy/myx119>.

RAMAGE, Gordon; RAJENDRAN, Ranjith; SHERRY, Leighann; WILLIAMS, Craig. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal Of Microbiology*, [S.L.], v. 2012, p. 1-14, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/528521>.

RAMAGE, Gordon; RAJENDRAN, Ranjith; GUTIERREZ-CORREA, Marcel; JONES, Brian; WILLIAMS, Craig. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *Fems Microbiology Letters*, [S.L.], v. 324, n. 2, p. 89-97, 8 set. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02381.x>.

RAJENDRAN, Ranjith; MOWAT, Eilidh; MCCULLOCH, Elaine; LAPPIN, David F.; JONES, Brian; LANG, Sue; MAJITHIYA, Jayesh B.; WARN, Peter; WILLIAMS, Craig; RAMAGE, Gordon. Azole Resistance of *Aspergillus fumigatus* Biofilms Is Partly Associated with Efflux Pump Activity. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, [S.L.], v. 55, n. 5, p. 2092-2097, maio 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01189-10>.

REICHERT-LIMA, Franqueline; LYRA, Luzia; PONTES, Lais; MORETTI, Maria Luiza; PHAM, Cau D.; LOCKHART, Shawn R.; SCHREIBER, Angélica Zaninelli. Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. *Mycoses*, [S.L.], v. 61, n. 6, p. 360-365, 23 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12759>.

RENEWICK, Julie; DALY, Paul; REEVES, Emer P.; KAVANAGH, Kevin. Susceptibility of Larvae of *Galleria mellonella* to Infection by *Aspergillus fumigatus* is Dependent upon Stage of Conidial Germination. *Mycopathologia*, [S.L.], v. 161, n. 6, p. 377-384, jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-006-0021-1>.

RENEWICK, Julie; REEVES, Emer P.; WIENTJES, Frans B.; KAVANAGH, Kevin. Translocation of proteins homologous to human neutrophil p47phox and p67phox to the cell membrane in activated hemocytes of *Galleria mellonella*. *Developmental & Comparative Immunology*, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 347-359, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2006.06.007>.

SALES, Maria da Penha Uchoa. Capítulo 5 - Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S.L.], v. 35, n. 12, p. 1238-1244, dez. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37132009001200012>.

SALES-CAMPOS, Helioswilton; TONANI, Ludmilla; CARDOSO, Cristina Ribeiro Barros; KRESS, Márcia Regina von Zeska. The Immune Interplay between the Host and the Pathogen in *Aspergillus fumigatus* Lung Infection. *Biomed Research International*, [S.L.], v. 2013, p. 1-14, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/693023>.

SAMSON, R. A.; What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Utrecht, v. 47, n. 1, p. 13-20, fev. 2009.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies In Mycology**, [S.L.], v. 78, p. 141-173, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.

SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. Cap.54. p.799-807

SATISH, Shruthi; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, Cristina; ZHAO, Yanan; LEE, Min Hee; DOLGOV, Enriko; KRÜGER, Thomas; PARK, Steven; DENNING, David W.; KNIEMEYER, Olaf; BRAKHAGE, Axel A.. Stress-Induced Changes in the Lipid Microenvironment of β -(1,3)-D-Glucan Synthase Cause Clinically Important Echinocandin Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Mbio**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 1-15, 4 jun. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00779-19>.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241–6246.

SEIDLER, Marc J.; SALVENMOSER, Stefanie; MÜLLER, Frank-Michael C. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 52, n. 11, p. 4130-4136, 2008.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Medica*, 1999

SKOV M, Main KM, Sillesen IB, Müller J, Koch C, Lanng S. Iatrogenic adrenal insufficiency as a side-effect of combined treatment of itraconazole and budesonide. *Eur Respir J*. 2002 Jul;20(1):127-33. doi: 10.1183/09031936.02.00248002. PMID: 12166560.

SNELDERS, Eveline, et al. “Azole Resistance Profile of Amino Acid Changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A Based on Protein Homology Modeling”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, junho de 2010. world, *journals.asm.org*, <https://doi.org/10.1128/AAC.01599-09>.

SOKOL-ANDERSON Marcia L., Janina Brajtburg, Gerald Medoff, Amphotericin B-Induced Oxidative Damage and Killing of *Candida albicans*, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 154, Issue 1, July 1986, Pages 76–83, <https://doi.org/10.1093/infdis/154.1.76>

SPIESS, Birgit; POSTINA, Patricia; REINWALD, Mark; CORNELLY, Oliver A.; HAMPRECHT, Axel; HOENIGL, Martin; LASS-FLÖRL, Cornelia; RATH, Peter-Michael; STEINMANN, Jörg; MIETHKE, Thomas. Incidence of Cyp51 A Key Mutations in *Aspergillus fumigatus*—A Study on Primary Clinical Samples of Immunocompromised Patients in the Period of 1995–2013. *Plos One*, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 103-113, 29 jul. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103113>.

STANDAR, Kerstin; KREIKEMEYER, Bernd; REDANZ, Sylvio; MÜNTER, Wanja L.; LAUE, Michael; PODBIELSKI, Andreas. Setup of an In Vitro Test System for Basic Studies on Biofilm Behavior of Mixed-Species Cultures with Dental and Periodontal Pathogens. *Plos One*, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 13135-13148, 1 out. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013135>.

STEENWYK JL, Shen XX, Lind AL, Goldman GH, Rokas A. A Robust Phylogenomic Time Tree for Biotechnologically and Medically Important Fungi in the Genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *mBio*. 2019 Jul 9;10(4): e00925-19. doi: 10.1128/mBio.00925-19. PMID: 31289177; PMCID: PMC6747717.

TASHIRO, M.; Izumikawa, K.; Minematsu, A.; Hirano, K.; Iwanaga, N.; Ide, E.; Mihara, T.; Hosogaya, N.; Takazono, T.; Morinaga, Y.; *et al.* Antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 584–587.

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. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2018.05.003>.

VAN DER LINDEN, J.W.M.; Arendrup, M.C.; Warris, A.; Lagrou, K.; Pelloux, H.; Hauser, P.M.; Chryssanthou, E.; Mellado, E.; Kidd, S.E.; Tortorano, A.M.; *et al.* Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Cdc. Eid. J.* 2015, 21, 1041–1044

VERWEIJ PECA, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis.* 2015;civ885.

VILLENA, G.K.; GUTIERREZ-CORREA, M.. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters In Applied Microbiology*, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 262-268, set. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2006.01960.x>.

WALSH, Thomas J.; HAYDEN, Randall T.; LARONE, Davise H. Identification of Fungi in Culture. *In: Larone's Medically Important Fungi-A guide to identification*. 3rd. Edition, ASM Press (Washington DC), 2018.

WITTWER, Daniela; FRANCHINI, Antonella; OTTAVIANI, Enzo; WIESNER, Andreas. PRESENCE OF IL-1- AND TNF-LIKE MOLECULES IN GALLERIA MELLONELLA (LEPIDOPTERA) HAEMOCYTES AND IN AN INSECT CELL LINE FROM ESTIGMENE ACRAEA (LEPIDOPTERA). *Academic Press*, [S.I.], v. 11, n. 9, p. 637-642, set. 1999.

ZAKARIA, Ayate; OSMAN, Marwan; DABBOUSSI, Fouad; RAFEI, Rayane; MALLAT, Hassan; PAPON, Nicolas; BOUCHARA, Jean-Philippe; HAMZE, Monzer. Recent trends in the epidemiology, diagnosis, treatment, and mechanisms of resistance in clinical *Aspergillus* species: a general review with a special focus on the middle eastern and north african region. **Journal Of Infection and Public Health**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-10, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2019.08.007>

ZHANG, Jianhua; ZOLL, Jan; ENGEL, Tobias; HEUVEL, Joost van Den; VERWEIJ, Paul E.; DEBETS, Alfons J. M.. The Medical Triazole Voriconazole Can Select for Tandem Repeat Variations in Azole-Resistant *Aspergillus Fumigatus* Harboring TR34/L98H Via Asexual Reproduction. *Journal Of Fungi*, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 277-289, 11 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6040277>.

ZHANG, Jianhua; DEBETS, Alfons J. M.; VERWEIJ, Paul E.; SNELDERS, Eveline. Azole-Resistance Development; How the *Aspergillus fumigatus* Lifecycle Defines the Potential for Adaptation. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 599, 24 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof7080599>.

ZORAN, Tamara *et al.* Azole-Resistance in *Aspergillus terreus* and Related Species: An Emerging Problem or a Rare Phenomenon? **Frontiers In Microbiology**, [S.I.], v. 9, n. 516, p. 1-9, mar. 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00516>

