UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

ILDNAY DE SOUZA LIMA BRANDÃO

INFLUÊNCIA DA ELASTINA NA PRODUÇÃO DE BIOFILME E DA GLIOTOXINA POR ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Aspergillus fumigatus*

Recife
2017

ILDNAY DE SOUZA LIMA BRANDÃO

INFLUÊNCIA DA ELASTINA NA PRODUÇÃO DE BIOFILME E DA GLIOTOXINA POR ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Aspergillus fumigatus*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biologia de Fungos.

Área de concentração: Micologia Aplicada – Fungos de interesse médico.

Orientadora: Profª. Drª. Neiva Tinti de Oliveira
Co-orientadores: Profª. Drª. Oliane Maria Correia Magalhães
Dr. Bartolomeu Acioli

Recife
2017

Catalogação na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Brandão, Ildnay de Souza Lima
Influência da elastina na produção de biofilme e da gliotoxina por isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus fumigatus* / Ildnay de Souza Lima Brandão - 2017.
126 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Oliveira, Neiva Tinti de
Coorientadores: Oliane Maria Correia Magalhães
Bartolomeu Acioli
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

1. *Aspergillus fumigatus* 2. Aspergilose pulmonar 3. Biofilme I. Oliveira, Neiva Tinti de (orient.) II. Magalhães, Oliane Maria Correia (coorient.) III. Acioli, Bartolomeu (coorient.) IV. Título

616.96901 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2019-055

ILDNAY DE SOUZA LIMA BRANDÃO

INFLUÊNCIA DA ELASTINA NA PRODUÇÃO DE BIOFILME E DA GLIOTOXINA POR ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Aspergillus fumigatus*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 03/03/2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Dra. Girliane Regina da Silva (Examinador externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

_____
Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Dra. Patrícia Vieira Tiago (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Dra. Rejane Pereira Neves (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

A Deus, pelo seu infinito amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Departamento de Micologia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelas oportunidades e contribuições em minha caminhada como aluna e pessoa.

Ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento concedido.

À minha orientadora, professora Drª. Neiva Tinti de Oliveira, pelas horas a mim dispensadas, amizade e seus conselhos.

À minha co-orientadora, mas sempre orientadora, professora Drª. Oliane Maria Correia Magalhães, pelo seu empenho, cuidado, dedicação, amizade e por seu exemplo de pessoa e profissional.

Ao Dr. Bartolomeu Acioli do Laboratório Aggeu Magalhães, por todo empenho e conhecimento.

Aos professores do Laboratório de Micologia Médica, professora Drª. Rejane Pereira Neves, pela amizade, incentivo e valiosos ensinamentos, e ao professor Dr. Armando Marsden, pelos seus ensinamentos e momentos de descontração.

À professora Drª. Cristina Maria de Souza Motta pelo seu incentivo, disponibilidade e amizade. E toda equipe da Micoteca URM, pelos seus conhecimentos, e disponibilidade de espaço e recursos na realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Micologia, por disponibilizarem seus laboratórios e equipamentos para viabilizar a realização deste trabalho. Em especial ao professor Dr. Gladstone Alves da Silva, pela sua amizade.

À professora Drª. Danielle Macêdo, Departamento de Farmácia da UFPE, pela sua boa vontade e disponibilidade de sempre ajudar.

À Drª. Girliane Regina da Silva e a professora Drª. Tânia Sarmento, do Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo seu valioso auxílio e disponibilidade.

Ao Dr. Paulo Euzébio e à Drª. Dijanah Cota Machado, Departamento de Biofísica da UFPE, pelos seus ensinamentos, disponibilidade e valiosos auxílio.

À professora Drª. Isvania Serafim e Drª. Tereza Jansem, Departamento de Biofísica da UFPE, pelo valioso auxílio na experimentação animal.

À Madi Diniz e ao setor de Hematologia do HC-UFPE pela gentileza e disponibilidade na realização dos hemogramas.

À técnica Silvania Paz, Departamento de Patologia da UFPE pelo auxílio no processamento do material e confecção das lâminas do histopatológico.

À Elaine Silva e Elias Silva, técnicos da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF-UFPE) pela gentileza na realização da microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco – LANAGRO-PE, pela compreensão e auxílio, em especial à Ana Jacqueline, responsável pelo Laboratório de Cultivo de Células, do qual faço parte.

Ao meu querido noivo, Joobson Camêlo, pelo seu apoio incondicional, sua paciência, gentileza, sua força de espírito, exemplo de sobriedade e racionalidade; pelas horas que passou sem o conforto do nosso lar, para estar no laboratório me acompanhando, pela compreensão da minha ausência e por tanto mais, sem o qual, certamente, não conseguiria chegar a este momento.

À minha mãe, Irene, exemplo de pessoa, pelo seu amor e força incondicional. À minha irmã Illanna pelo seu apoio, amizade, amor e por me dar a pessoinha mais querida do mundo, minha sobrinha Maria Luísa, cujo sorriso e peraltices me fazem sempre continuar.

À minha amiga e companheira de jornadas noturnas de experimentos, Heloíza Maria, pela sua paciência, companheirismo, dedicação, por todas as horas que se dispôs a estar em laboratório até de madrugada em detrimento ao seu lar. Ao querido amigo Renato, seu cônjuge, pelo auxílio científico e por sua paciência e amizade.

Aos amigos, Michellângelo Nunes, Pamella Ximenes, Rafael Vilela, Franz deAssis, Daniela Buonafina, Melyna Chaves, Aline Julião, Adriana Patrícia e Renato Souza pelo seu imenso afeto, ajuda, amizade, descontração e terapia.

A todos os colegas do Laboratório de Micologia Médica, em especial ao técnico Rubens Celso (*in memorian*).

Aos amigos Amanda, Túlio, Arthur, Daniela, Eliliane e Rosilene pela amizade e horas de descontração e apoio.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ” (SHOPENHAUER, 2010, p. 157)

RESUMO

Aspergillus fumigatus é o principal agente etiológico da aspergilose pulmonar, cuja forma invasiva apresenta taxa de mortalidade de até 90% dos casos. A influência de fatores do ambiente pulmonar do hospedeiro, como a elastina, na virulência deste fungo não tem sido estudados até o momento. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar fatores de virulência de isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus*, determinando a influência da elastina no desenvolvimento do biofilme e na produção de gliotoxina (GT), bem como determinar o grau de invasibilidade do tecido pulmonar em modelo experimental de aspergilose pulmonar. Foram utilizados 20 isolados de *A. fumigatus*, originados de amostras ambientais e de espécimes clínicos, mantidos na Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. A capacidade de produção de biofilme foi observada utilizando-se meio RPMI 1640, a 37 °C por 24, 48 e 72 horas. Morfologia, quantidade de matriz extracelular (MEC), hidrofobicidade do biofilme e quantidade de GT produzida, foram estudadas por microscopia eletrônica de varredura, marcação com Alexa Fluor® 488 (CAAF), ensaio com microesferas de látex modificadas e por cromatografia líquida de alta eficiência, respectivamente. O modelo experimental foi realizado com camundongos (*Mus muscullus*), em grupos de animais imunossuprimidos e não imunossuprimidos. Independentemente da origem ou tempo de preservação, todos os isolados foram capazes de formar biofilme, destacando-se, em todos os períodos de tempo avaliados, os isolados URM 5698, URM 5943, URM 5992, de origem ambiental, e URM 6562 e URM 6573, obtidos de amostras clínicas, não apresentando diferença entre si (p=0,1447). O isolado URM 3812 apresentou menor capacidade de formação de biofilme. A quantidade de biofilme produzido aumentou proporcionalmente ao tempo decorrido ($p\leq$0,0001), sendo 48 horas o período mais satisfatório para as análises. Morfologicamente, o biofilme se apresentou como uma estrutura complexa, envolvida por uma MEC, além de ter sido possível a observação de anastomose entre hifas. A concentração de 10 mg/mL de elastina foi capaz de influenciar positivamente a produção de biofilme dos isolados (p<0,0001) em todos os períodos de tempo estudados, atingindo peso seco de 18,8 mg em 72 horas. Assim como, promoveu aumento da quantidade de MEC produzida (p=0,0042) e diminuição de sua hidrofobicidade (p=0,005). A elastina foi capaz de provocar aumento na produção de GT (p<0,0001) durante o desenvolvimento do biofilme. Os isolados URM 6573 e URM 3812 foram igualmente capazes de causar aspergilose pulmonar comprovada nos camundongos imunossuprimidos, e de induzir resposta inflamatória maciça, que pôde ser visualizada nos cortes de tecido pulmonar. Contudo, nos animais infectados pelo

isolado URM 3812, produtor de GT, foram observadas regiões de opacidade pulmonar, além de áreas de necrose com destruição tecidual, diferentemente daqueles infectados pelo isolado URM 6573, não produtor de GT. Assim, é possível concluir que fatores do hospedeiro, como a elastina, possuem influência na progressão da aspergilose pulmonar, carecendo de mais estudos afim de detalhar melhor o papel desta proteína na patogênese da doença, fornecendo base ao conhecimento para o desenvolvimento de mecanismos capazes de inibir o estabelecimento ou progressão desta doença.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus.* Biofilme. Gliotoxina. Elastina.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is the main causative agent of pulmonary aspergillosis, whose invasive form presents a mortality rate of up to 90% of the cases. The influence of factors of the host lung environment, such as elastin, on the virulence of this fungus has not been studied to date. The objective of this work was to evaluate the virulence factors of *A. fumigatus* clinical and environmental strains, determining the influence of elastin on biofilm development and on the gliotoxin production (GT), as well as to determine the degree of pulmonary tissue invasion in an experimental model of pulmonary aspergillosis. Twenty isolates of *A. fumigatus*, originating from environmental samples and clinical specimens, from the Culture Collection University Recife Micology URM of the Federal University of Pernambuco, were used. The biofilm production capacity was observed using RPMI 1640 medium at 37 °C for 24, 48 and 72 hours. Morphology, amount of extracellular matrix (ECM), biofilm hydrophobicity and amount of GT produced, were studied by scanning electron microscopy, Alexa Fluor® 488 (CAAF) labeling, modified latex microspheres and high performance liquid chromatography, respectively. The experimental model was performed with mice (*Mus muscullus*), in groups of immunosuppressed and non immunosuppressed animals. Independently of the origin or time of preservation, all the isolates were able to form biofilm, with emphasis for environmental strains URM 5698, URM 5943, URM 5992, and clinical strains URM 6562 and URM 6573, there is no difference between them (p=0.1447). The URM 3812 isolate had a lower capacity for biofilm formation. The amount of biofilm produced increased proportionally to the elapsed time ($p \leq 0.0001$), with 48 hours being the most satisfactory period for analysis. Morphologically, the biofilm presented as a complex structure, involved by an ECM, and it was possible to observe anastomosis between hyphae. The concentration of 10 mg/mL of elastin was able to positively influence the biofilm production of the isolates ($p<0.0001$) in all the periods studied, reaching a dry weight of 18.8 mg in 72 hours. As well as, it promoted an increase in the amount of ECM produced (p=0.0042) and a decrease in its hydrophobicity (p=0.005). Elastin was able to cause increased GT production ($p<0.0001$) during biofilm development. URM 6573 and URM 3812 isolates were also able to cause pulmonary aspergillosis in immunocompromised mice and to induce a massive inflammatory response that could be seen in the pulmonary tissue sections. However, in the animals infected with the URM 3812, a producer of GT, regions of pulmonary opacity were observed, as well as areas of necrosis with tissue destruction, unlike those infected by URM 6573, which was not a GT producer. Thus, it is

possible to conclude that host factors, such as elastin, influence the progression of pulmonary aspergillosis, requiring more studies to better detail the role of this protein in the pathogenesis of the disease, providing a basis for the development of mechanisms capable of inhibit the establishment or progression of this disease.

Keywords: *Aspergillus fumigatus.* Biofilm. Gliotoxin. Elastin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) de pulmão evidenciando a presença de massa sólida no interior de uma cavidade oval localizada no lobo superior direito (seta amarela)..... 44

Figura 2 – Estrutura química da gliotoxina..... 58

Figura 3 – Representação esquemática do desenvolvimento de biofilme de *Aspergillus fumigatus*, iniciando pela adesão dos conídios, germinação (8h), monocamada de hifas entrelaçadas (12h) e biofilme maduro envolto por uma matriz extracelular (24h), acompanhados por micrografias obtidas de microscopia confocal a laser usando FUN1..... 66

Figura 4 – Influência da elastina no crescimento do biofilme de *Aspergilllus fumigatus*. Fotomicrografia do biofilme de A. fumigatus URM 6573, 48 horas a 37 ºC em meio RPMI adicionado de 10 mg/mL de elastina, evidenciando sua complexa estrutura (A) e anastomose das hifas (B) (seta amarela). Biofilme de *A. fumigatus*, 48 horas a 37 ºC, em RPMI, sob microscopia de luz visível (C) e corado com Calcofluor White ® (D); Biofilme de *A. fumigatuas* em RPMI adicionado de 10 mg/mL de elastina sob microscopia de luz visível (E) e corado com Calcofluor White® (F), evidenciando arranjos circulares (seta amarela) e feixes paralelos de hifas (setas pretas). Aumento de 400 x. Barra de escala de 50 μm..... 81

Figura 5 – Fotomicrografia de biofilme de *Aspergilllus fumigatus* URM 6573, em 48 horas a 37 ºC, em RPMI (A) e RPMI suplementado com 10 mg/mL de eslastina (B), evidenciando maior produção de matriz extracelular na presença de elastina. Aumento de 1000 x e 15000 x, respectivamente..... 83

Figura 6 – Biofilme de *Aspergillus fumigatus* URM 6575 em RPMI acrescido de 10 mg/mL de elastina, 48 horas a 37 ºC, sob microscopia de luz visível (A) e marcado com Alexa Fluor® 488 (CAAF, Life Technologies, Alemanha) (B), evidenciando maior quantidade de matriz extracelular nas extremidades das hifas (Setas brancas). Aumento de 400 x. Barra de escala de 50 μm..... 84

Figura 7 – Biofilme de *Aspergillus fumigatus* URM 5992 em RPMI, 48 horas a 37 ºC, sob microscopia de luz visível (A) e marcada com microesferas de látex (B); e de biofilme na presença de elastina, sob microscopia de luz visivel (C) e marcada (D). Aumento de 400 x. Barra de escala de 50 μm..... 87

Figura 8 – Cromatogramas do padrão de gliotoxina pura (A); da gliotoxina produzida durante o desenvolvimento do biofilme de *Aspergillus fumigatus* URM 3812 em RPMI (B) e em RPMI com 10 mg/mL de elastina (C), pós 48 horas a 37 °C..... 90

Figura 9 – Animal eutansiado após 48 horas de infecção, com exposição de órgãos, apesentando regiões de aspecto opaco (seta e círculo amarelos), indicando possível foco de infecção pulmonar..... 93

Figura 10 – Animal infectado pelo isolado URM 3812, eutansiado após 48 horas, com caixa torácica aberta, evidenciando área de necrose pulmonar (A), e lobo pulmonar apresentando opacidade, provável foco de infecção (B). Pulmão de animal infectado pelo isolado URM 6573, com ausência de regiões opacas (C)..... 94

Figura 11 – Exame direto de fragmentos de pulmão clarificado com hidróxido de potássio a 40%, evidenciando filamentos micelianos hialinos, septados dicotômicos (setas) e sem dicotomia, após 48 horas de infecção (400x)..... 95

Figura 12 – Placas de Petri com fragmentos de tecido pulmonar de camundongo, após 48 horas de infecção, no tempo 0 (zero) (A), 3 dias (B), 5 dias (C) e 8 dias (D) de inoculação em meio Ágar Sabouraud, mantido a 37 °C. Conídios e parte do conidióforo de *Aspergillus fumigatus* isolado da cultura de fragmentos de tecido pulmonar (1000 x) (E). Barra de escala de 10 μm..... 95

Figura 13 – Exame histopatológico de fragmentos de tecido pulmonar de camundongos após 48 horas (A) e 72 horas (B) de infecção, corado por hematoxilina eosina, demonstrando a presença de filamentos micelianos septados dicotômicos compatíveis para infecção fúngica (setas amarelas), além de intenso infiltrado neutrofílico (setas pretas) (400 x)..... 96

Figura 14 – Invasão do lúmem de bronquíolo de camundongo (seta amarela) infectado por *Aspergillus fumigatus*, evidenciado pelo exame histopatológico de fragmentos de tecido pulmonar, corado por hematoxilina eosina. No detalhe é possível a visualização de hifas permeando vasos sanguíneos (seta preta) (400 x)..... 97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Média da produção de biofilme por idolados de *Aspergillus fumigatus* em função do tempo..... 77

Gráfico 2 – Influência da elastina no crescimento do biofilme de *Aspergilllus fumigatus*. Média da produção de biofilme pela absorbância com cristal violeta 0,5% (A) e peso seco (B) dos isolados URM 5992, origem ambiental, e URM 6573, origem clínica, de *A. fumigatus*..... 78

Gráfico 3 – Influência da elastina na produção de matriz extracelular (MEC) no biofilme de *Aspergillus fumigatus*..... 82

Gráfico 4 – Influência da elastina na hidrofobicidade do biofilme de *Aspergillus fumigatus*..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem e identificação dos isolados de *Aspergillus fumigatus* utilizados..... 25

Tabela 2 – Gupos de animais e esquema imunossupressor para estabelecimento de modelo experimental de aspergilose pulmonar..... 31

Tabela 3 – Critérios para diagnóstico de Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA) em pacientes com asma e fibrose cística, segundo consensos de 2003, 2012 e 2013..... 41

Tabela 4 – Média da produção de biofilme (absorbância 570 nm) de isolados de amostras ambientais e espécimes clínicos de *Aspergilus fumigatus* em função do tempo de desenvolvimento..... 75

Tabela 5 – Média da produção de gliotoxina durante o desenvolvimento do biofilme do *Aspergilus fumigatus* URM 3812 ao longo do tempo..... 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
AI	Aspergilose invasiva
AIDS	*Acquired immunodeficiency syndrome* / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AspF1p	Ribotoxina
ATB	Aspergilose traqueobrônquica
ATP	Trifosfato de adenosina
CAAF	Alexa Fluor 488 (Conjugado a Concanavalina-A)
CatBp	Catalase B
CB	Centro de Biociências
CEUA	Comitê de Ética em Utilização de Animais
CID	Classsificação Internacional de Doenças
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CZ	Ágar Czapek
DAD	Detector de arranjos diiodos
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DppVp	Dipeptidilpeptidase V
eDNA	Ácido desoxirribonucleico extracelular
et al.	e outro
ETPs	Epipolitiodioxopiperazinas
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose cística
GAG	Galactosaminogalactano
GM	Galactomanana
GPI	Proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol
GT	Gliotoxina
HIV	*Human Immunodeficiency Virus* / Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	*High performance liquid chromatography* / Cromatografia líquida de alta eficiência
IFIs	Infecções fúngicas invasivas
IL	Interleucina
ITS	*Internal transcribed spacer* / Espaçadores transcritos internos

LBA	Lavado broncoalveolar
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LPMNs	Leucócitos polimorfonocleares
MALDI-TOF MS	*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry* / Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MOPS	Tampão de 3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMNs	Neutrófilos polimorfonucleares
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas do oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
SDA	Ágar Sabouraud dextrose
S/N	Relação sinal/ruído
SNPs	Polimorfismos de base única
TCAR	Tomografia computadorizada de alta resolução
TLR	Receptores *Toll-like*
TMO	Transplante de medula óssea
TNF	Fator de necrose tumoral
TR	Tempo de retenção
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
URM	Coleção de Culturas Micoteca - *University Recife Mycology*
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRUDUÇÃO..... 22
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO..... 23
1.2 OBJETIVOS..... 24
1.2.1 Objetivo Geral..... 24
1.2.2 Objetivos Específicos..... 24
1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS..... 25
1.3.1 Organismos e condições de cultura..... 25
1.3.2 Condições de crescimento e padronização do inóculo 25
1.3.3 Formação de biofilme por *Aspergillus fumigatus*..... 26
1.3.4 Quantificação de biofilme..... 26
1.3.5 Quantificação de Matriz Extracelular..... 27
1.3.6 Quantificação da hidrofobicidade do biofilme..... 27
1.3.7 Produção de gliotoxina (GT)..... 28
1.3.7.1 Extração de metabólitos do biofilme de *A. fumigatus*..... 28
1.3.7.2 Quantificação de gliotoxina por CLAE..... 28
1.3.8 Microscopia do biofilme..... 29
1.3.8.1 Microscopia de fluorescência..... 29
1.3.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... 30
1.3.9 Estabelecimento de aspergilose pulmonar em modelo animal..... 30
1.3.9.1 Animais..... 30
1.3.9.2. Regime de imunossupressão..... 30
1.3.9.3. Infecção experimental..... 30
1.3.10 Análise estatística e apresentação dos dados..... 32
2 REVISÃO DA LITERATURA..... 33
2.1 ASPERGILOSE..... 33
2.1.1 Breve histórico..... 33
2.1.2 Patogênese..... 34
2.1.3 Fatores de Risco..... 36
2.1.4 Epidemiologia..... 37
2.1.5 Formas clínicas, diagnóstico e tratamento..... 38
2.1.5.1 Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA)..... 39

2.1.5.2 Aspergiloma..... 42
2.1.5.3 Aspergilose Invasiva (AI)..... 46
2.1.6 Modelos experimentais de Aspergilose..... 47
2.2 *ASPERGILLUS* (Micheli ex Link 1809)..... 49
2.2.1 *Aspergillus fumigatus* (Fresenius 1863)..... 53
2.2.1.1 Fatores de Virulência..... 53
2.2.1.2 Gliotoxina..... 56
2.3 BIOFILME DE *Aspergillus fumigatus*..... 61
2.3.1 Etapas de formação e características do biofilme..... 63
2.3.1.1 Adesão..... 63
2.3.1.2 Desenvolvimento..... 64
2.3.1.3 Resistência ao antimicrobianos..... 69
2.3.1.4 Matriz Extracelular..... 70
3 ANÁLISE DOS RESULTADOS..... 74
3.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *A. fumigatus* 74
3.2 PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *A. fumigatus* NA PRESENÇA DE ELASTINA..... 77
3.3 PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR NO BIOFILME DE *A. fumigatus* 82
3.4 HIDROFOBICIDADE DO BIOFILME DE *A. fumigatus* 85
3.5 INFLUENCIA DA ELASTINA NA PRODUÇÃO DE GLIOTOXINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE *A. fumigatus*..... 88
3.6 MODELO EXPERIMENTAL DE ASPERGILOSE PULMONAR..... 91
4 CONCLUSÃO..... 98
REFERÊNCIAS..... 99
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO NA BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY..... 123
ANEXO B - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)..... 124
ANEXO C - HEMOGRAMA DE CAMUNDONGO SAUDÁVEL NÃO IMUNOSSUPRIMIDO..... 125

ANEXO D - HEMOGRAMA DE CAMUNDONGO SAUDÁVEL IMUNOSSUPRIMIDO..... 126

1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas oportunistas em pacientes imunocomprometidos aumentou significativamente nos últimos anos, sendo a aspergilose uma importante causa de morbidade e mortalidade variando de 70 a 90% dos casos (CAMPS et al., 2012; O'GORMAN, 2011; TACCOME et al*.,* 2015).

A principal via de infecção é a inalação dos conídios fúngicos pelo hospedeiro, sendo o pulmão o principal órgão acometido, podendo a infecção se disseminar para os demais órgãos (LEWIS et al., 2013; O'GORMAN, 2011). Esta doença apresenta como principais formas clínicas a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergiloma e aspergilose invasiva (AI), sendo *Aspergillus fumigatus* responsável por aproximadamente 90% dos casos. No entanto, o número de outras espécies causando a doença vem aumentando, incluindo *A. flavus, A. niger, A. terreus, A. nidulans, A. ustus* e *A. ochraceus* (ALANGADEN, 2011; BABAMAHMOODI et al*.,* 2015; CAMPS et al., 2012; LAI et al., 2008; LASS-FLÖRL, 2009).

O aspergiloma e AI se desenvolvem como "macro" e "microcolônias", respectivamente, no interior do pulmão circundadas por uma matriz de exopolissacarídeos (DOUGLAS, 2003; LEWIS, 2001). Assim, ambas as formas vêm sendo discutidas e consideradas como biofilmes formados *in vivo*. Este fato é sustentado pela resistência à terapia antifúngica apresentada por estas formas clínicas e compartilhada com o biofilme de *A. fumigatus in vitro*, demonstrada pela ausência de penetração de drogas através do biofilme (BEAUVAIS et al., 2007; FIORI et al., 2011; MOWAT et al., 2007, 2008b; RAJENDRAN et al., 2011; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008).

Em comunidades multicelulares, o fungo adquire vantagens na colonização do substrato e na resistência à agressões externas tais como, ações do sistema imunológico do hospedeiro e os agentes antifúngicos (BEAUVAIS et al., 2007; RAMAGE et al., 2011a). Diversos trabalhos têm demonstrado a composição da matriz que envolve as células no biofilme de vários microrganismos. Beauvais et al. (2007) demonstraram a presença de uma matriz extracelular (MEC) hidrofóbica composta, principalmente por galactomanana, α-1,3-glucano, monossacarídeos, melanina e hidrofobinas, ligando coesivamente as hifas de *A. fumigatus* em um invólucro contíguo.

Para invadir o hospedeiro, espécies de *Aspergillus* precisam aderir e penetrar os tecidos, assim como dispor de mecanismos para se evadir do sistema imunológico do hospedeiro. Estudos têm buscado fatores de virulência e o seu papel na patogênese da

infecção. Tolerância à temperatura, taxa de crescimento, tamanho dos conídios, adesinas, produção de pigmentos, metabólitos tóxicos e enzimas extracelulares são fatores de virulência de espécies de *Aspergillus* e outros fungos (AL-ALAWI et al., 2005; ALP; ARIKAN, 2008; CHOTIRMALL et al., 2014; KUPFAHL et al., 2008; OKUMURA et al., 2004).

Aspergillus fumigatus secreta numerosos metabólitos secundários, dentre os quais o de maior interesse é a gliotoxina, devido às suas potentes propriedades imunossupressoras e citotóxicas, indicando um potencial fator de virulência (ASKEW, 2008; DAGENAIS; KELLER, 2009; SUGUI et al., 2007b). Estudos indicam que a deleção de genes envolvidos na biossíntese da gliotoxina em cepas de *A. fumigatus* resultou na interrupção da síntese de gliotoxina, com consequente redução dos efeitos *in vitro* (SUGUI et al., 2007b).

O desenvolvimento deste fungo nos pulmões e seu angiotropismo, colocam-no em contato direto com a elastina, um dos principais componentes estruturais dos pulmões e vasos sanguíneos, a qual é fundamental para sua fisiologia (FILLER; SHEPPARD, 2006; KAMAI et al., 2006). A correlação entre a produção de elastase por *A. fumigatus* e o desenvolvimento de AI tem sido relatada (KHOSRAVI et al., 2012). Foi demonstrada a influência de fatores do hospedeiro como, de proteínas séricas e DNA extracelular na produção e desenvolvimento do biofilme deste fungo (SHOPOVA et al., 2013; TOYOTOME et al., 2012).

Por meio da execução de modelos experimentais, é possível avaliar e comparar a virulência de espécies de *Aspergillus* patogênicas ao homem, levando à uma melhor compreensão da virulência característica destes fungos (GRAVELAT et al., 2008).

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

O estudo da influência de fatores do hospedeiro, no desenvolvimento de mecanismos de resistência e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, apresentados pelo *A. fumigatus*, como a formação de biofilme e produção de gliotoxina, permitirá melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, bem como da dinâmica do processo de estabelecimento da doença.

Sendo a aspergilose uma doença grave e debilitante, com altas taxas de mortalidade, o conhecimento dos fatores que determinam o grau de virulência dos fungos causadores desta doença, é uma etapa importante para a identificação de potenciais alvos para drogas, melhorando assim a terapêutica, com diminuição de custos e melhor prognóstico e qualidade de vida para os pacientes.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar fatores de virulência de isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus,* determinado a influência da elastina no desenvolvimento do biofilme de *A. fumigatus* e na produção de gliotoxina durante o desenvolvimento deste, bem como determinar o grau de invasibilidade do tecido pulmonar em modelo experimental de aspergilose pulmonar.

1.2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a capacidade de produção de biofilme de isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus*;
b) Qualificar a influência do tempo de preservação na capacidade de produção de biofilme de isolados de *A. fumigatus*;
c) Demonstrar a influência da elastina no desenvolvimento do biofilme de *A. fumigatus*;
d) Avaliar a influência da elastina na produção de MEC do biofilme de *A. fumigatus*;
e) Determinar a modificação da hidrofobicidade da MEC do biofilme de *A. fumigatus* causada pela presença de elastina;
f) Qualificar a produção de glitoxina de isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* durante o desenvolvimento do biofilme;
g) Evidenciar a influência da elastina na produção de gliotoxina durante o desenvolvimento do biofilme de *A. fumigatus*;
h) Avaliar a invasibilidade do tecido pulmonar de isolados de *A. fumigatus* em modelo experimental de aspergilose pulmonar.

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

1.3.1 Organismos e condições de cultura

Foram utilizados 20 isolados de *A. fumigatus*, provenientes de substratos ambientais (10) e de espécimes clínicos (10), mantidos na Coleção de Culturas Micoteca - University Recife Mycology (URM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE (Tabela 1); com taxonomia confirmada por métodos de biologia molecular e características morfológicas macro e microscópicas**.** Os isolados foram mantidos a 28 ºC em ágar extrato de malte contido em tubos de ensaio.

Tabela 1 – Origem e identificação dos isolados de *Aspergillus fumigatus* utilizados.

Origem	Identificação	Substrato de isolamento	Ano de depósito
Ambiental	URM 3550	Aveia beneficiada	1994
	URM 3812	Poupa de maracujá	1997
	URM 3933	Água do Rio Capibaribe/Recife-PE	1997
	URM 4320	Solo de mineradora/ Jaguariba-BA	2001
	URM 4956	Solo	2003
	URM 5492	Farinha de amendoim	2007
	URM 5698	Torta de mamona industrial	2007
	URM 5943	Solo de Mata Atlântica/ Recife-PE	2009
	URM 5992	Solo de Caatinga/ Pernambuco	2009
	URM 6151	Solo de Mata Atlântica/ Recife-PE	2010
Clínica	URM 5049	Fragmento de aorta abdominal	2005
	URM 6559	Lavado broncoalveolar	2012
	URM 6560	Esputo	2012
	URM 6562	Esputo	2012
	URM 6564	Lavado broncoalveolar	2012
	URM 6570	Esputo	2012
	URM 6571	Esputo	2012
	URM 6573	Lavado broncoalveolar	2012
	URM 6576	Esputo	2012
	URM 6577	Esputo	2012

URM= University Recife Mycology (Micoteca URM); PE= Pernambuco; BA= Bahia

1.3.2 Condições de crescimento e padronização do inóculo

Os isolados de *A. fumigatus* foram cultivados em Sabouraud dextrose ágar (SDA), contido em tubos de ensaio, e mantidos a 37 °C por 72 horas. Os conídios foram coletados por

lavagem da superfície das culturas utilizando 5 mL de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2 contendo Tween 20 a 0,025% (v/v), e ajustado o inóculo, para $1x10^5$ células em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) tamponado para pH 7.0 com MOPS 0,165 M, para produção de biofilme em placas de 96 poços (MOWAT et al., 2007); e um inóculo de $3,75x10^4$ células/cm^2 para quantificação do peso seco do biofilme, em placas poliestireno de seis poços (TOYOTOME et al., 2012).

1.3.3 Formação de biofilme por *Aspergillus fumigatus*

Foi analisada a produção de biofilme dos 20 isolados de *A. fumigatus* (Tabela 1), em três períodos de desenvolvimento, 24, 48 e 72 horas, e três repetições, com delineamento 20x3x3. O biofilme foi produzido em placas de poliestireno de 96 poços, de fundo chato, sendo adicionados 200 μL da suspensão celular previamente padronizada de cada isolado de *A. fumigatus*, separadamente, em RPMI, durante cada período de tempo determinado (24, 48 e 72 horas), incubado a 37 °C. Em cada intervalo de tempo, o meio de cultura foi removido dos orifícios e as células lavadas três vezes com PBS pH 7,2 para total remoção de células não aderentes (MOWAT et al., 2007).

Após obtenção dos resultados, as duas culturas que apresentaram maior quantidade de biofilme e de origens distintas, foram utilizadas para quantificação de biofilme na presença de elastina, utilizando RPMI contendo elastina (RPMI/Elastina) nas concentrações de 0,25 mg/mL, 1 mg/mL, 4 mg/mL e 10 mg/mL, durante cada período de tempo determinado (24, 48 e 72 horas), incubado a 37 °C. Os procedimentos que se sucedem foram realizados como anteriormente mencionado na produção de biofilme, com seis repetições, com delinemento experimental de 2x5x3x6 (MOWAT et al., 2007).

Para quantificação de peso seco do biofilme, suspensões de 3 mL de cada isolado foram colocadas, separadamente, em RPMI e RPMI/Elastina (0,25 mg/mL, 1 mg/mL, 4 mg/mL e 10 mg/mL) em placas poliestireno de seis poços, e incubadas a 37 ºC por 24, 48 e 72 horas, seguindo o mesmo delineamento experimental acima mencionado (TOYOTOME et al., 2012).

1.3.4 Quantificação de biofilme

Os biofilmes foram quantificados utilizando a técnica desenvolvida por O'Toole e Kolter (1998) e posteriormente modificada por Mowat et al. (2007). As placas de 96 poços

com o biofilme formado, foram secas e adicionados 100 µL de solução de cristal violeta 0,5% (p/v) por 5 minutos. A solução foi removida por lavagem cuidadosa sob água corrente para remoção do excesso. Os biofilmes foram descorados, adicionando 100 µL de etanol 95% a cada poço por um minuto e, posteriormente, o etanol foi transferido para uma outra placa de microtitulação e a absorbância lida a 590 nm (A590), em leitor VarioskanFlash com software SkanIt™ Software 2.4.5 RE (Thermo Scientific).

Para quantificação da biomassa do biofilme (peso seco), após os períodos de tempo pré-determinados o biofilme foi removido por raspagem e filtrado em filtros de papel (Miracloth/ 22 µm, Merck, Alemanha), os quais foram posteriormente secos em estufa, a 56 ºC, até peso constante (TOYOTOME et al., 2012).

1.3.5 Quantificação de Matriz Extracelular

Para a quantificação de matriz extracelular, foi utilizada metodologia de Shopova et al. (2013), na qual os biofilmes formados em meio RPMI e em RPMI/Elastina (10 mg/mL) por 48 horas a 37 ºC, foram marcados pela adição de 100 µL de solução de Alexa Fluor® 488 (CAAF, Life Technologies, Alemanha) de 25 µg/mL em PBS pH 7,2, acompanhada de incubação por 45 minutos a 37 ºC e 250 rpm. Os biofilmes foram lavados três vezes com PBS pH 7,2 e a intensidade da fluorescência foi mensurada utilizando o leitor VarioskanFlash com software SkanIt™ Software 2.4.5 RE (Thermo Scientific), com filtro de excitação de 485 nm e filtro de emissão de 520 nm. Soluções estoque de CAAF de 5mg/mL foram estocadas a -20 ºC e descongeladas imediatamente antes da utilização.

1.3.6 Quantificação da hidrofobicidade do biofilme

Para o teste de hidrofobicidade do biofilme, foi usado um ensaio de adesão de microesferas segundo Beauvais et al. (2007), no qual foram utilizadas microesferas de látex com sulfato modificado laranja (0,806 µm, Sigma-Aldrich). Os biofilmes crescidos em meio RPMI e RPMI/Elastina (10 mg/mL), por 48 horas a 37 ºC, foram lavados com solução de 0,1 M de Nitrato de potássio, pH 6,5, em seguida, misturou-se com 100 µL da solução de microesferas (10^9/mL), subsequentemente, a mistura foi agitada por 30 segundos e lavada extensivamente com solução de 0,1 M de Nitrato de potássio, pH 6,5. A quantidade de fluorescência emitida a partir da adesão das microesferas nas hifas foi mensurada utilizando

leitor VarioskanFlash com software SkanIt™ Software 2.4.5 RE (Thermo Scientific), com filtro de excitação de 520 nm e de emissão 540 nm.

1.3.7 Produção de gliotoxina (GT)

Para avaliação da influência da elastina na produção da GT durante o desenvolvimento do biofilme, foi utilizada a metodologia proposta por Kupfahl et al. (2008) modificada, na qual foram analisados os biofilmes desenvolvidos em meio RPMI e em RPMI/Elastina (10 mg/mL) em 24, 48 e 72 horas a 37 ºC, formados em placas de seis poços.

Para análise foram selecionados os isolados de menor e maior produção de biofilme, com quatro repetições; delineamento de 2x2x3x4.

1.3.7.1 Extração de metabólitos do biofilme de *A. fumigatus*

Ao final do cultivo, o biofilme foi filtrado em papel filtro quantitativo C40 (faixa branca 125 mm). À fase líquida obtida foi adicionada 25 mL de clorofórmio (grau HPLC, Sigma-Aldrich), para extração dos metabólitos, e a mistura foi deixada em contato por 10 minutos, em três repetições. Após esta etapa ocorreu a extração dos metabólitos secretados para o meio de cultura, utilizando a metodologia de partição líquido-líquido em balão de separação de 250 mL, com a qual foram separadas as duas fases não miscíveis formadas no sistema, a aquosa (líquido metabólico) da orgânica (solvente de extração, clorofórmio rico em metabólitos). A fase orgânica foi, então, concentrada em rotaevaporador (Tecnal TE2II) a 45 ºC e, em seguida, ressuspendida em 500 µL de acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha), e armazenada a 4 ºC até a análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

1.3.7.2 Quantificação de gliotoxina por CLAE

Para as análises por CLAE, utilizou-se o cromatógrafo líquido (Accela 600 Pump UHPLC, Thermo Scientific, California, EUA), constituído por uma bomba quaternária de 600 bar, degaseificador, forno de coluna e injetor automático, detector de arranjo diiodos (DAD), controlado pelo software ChromQuest 5.0. Foram usados filtros de membrana millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro (Supelco) para filtração das amostras e dos solventes: acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha), água Mili-Q (Millipore, EUA) e ácido acético (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha), o qual foi utilizado para o preparo da solução

acidificada. Foi utilizado padrão de GT pura (Sigma-Aldrich) dissolvida em 1 mL de metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) para estabelecimento da curva padrão e curva de calibração.

A análise da GT seguiu a metodologia descrita por Kupfahl et al. (2008). As amostras, previamente solubilizadas em acetonitrila foram filtradas em filtros de 0,45 μm. Foi utilizado uma coluna de fase reversa (Luna-C-18, 150 mm x 4,6 mm x 5 μm, Phenomenex) e pré-coluna *Security Guard Holder* (Phenomenex), temperatura de 35 °C, fluxo de 1,0 mL/min e fase móvel composta por água acidificada em 1,0% de ácido acético (Eluente A) e acetonitrila (Eluente B). Foi utilizado o sistema de eluição isocrático 75:25 (Eluente A: Eluente B). Para quantificação da GT nas amostras foi obtido uma curva de calibração nas concentrações: 1,0; 0,8; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL de padrão de GT. O volume injetado foi de 5 μL para amostra padrão e amostras testes. Os cromatogramas foram monitorados em comprimento de onda de 254 nm.

As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear de áreas de pico integradas (y) versus concentrações (x). O limite de detecção (LOD) foi determinado a uma relação sinal-ruído (S/N) de 3,0, e o limite de quantificação (LOQ) foi determinado a razão de S/N de 10,0.

1.3.8 Microscopia do biofilme

1.3.8.1 Microscopia de fluorescência

Para análise microscópica de fluorescência, o biofilme foi crescido sob lamínulas (22 mm x 22 mm) em meio RPMI e RPMI/Elastina (10 mg/mL) a 37 ºC por 48 horas, em placas de poliestireno de seis poços. Decorrido este período de tempo, as lamínulas foram retiradas e o biofilme tratado de acordo com o objetivo da análise.

A fim de visualizar a estrutura do biofilme formado em meio RPMI e RPMI adicionado de elastina, o biofilme foi corado com 100 μL de Calcofluor White® (Sigma-Aldrich), utilizando filtros de excitação/emissão de 346/433 nm, para obtenção de cor azul (BEAUVAIS et al., 2007). Para os ensaios de quantificação de MEC e de hidrofobicidade, os mesmos seguiram como já descritos anteriormente para quantificação da fluorescência nos itens 1.3.5 e 1.3.6.

As imagens foram obtidas utilizando o microscópio de fluorescência Leica DMI 4000B (Alemanha), utilizando o software Leica Microsystems LAS AF.

1.3.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise ultraestrutural do biofilme, o mesmo foi crescido como descrito para a microscopia de fluorescência (item 1.3.8.1) , sendo, após crescimento, a estrutura fixada em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M a 4 °C; pós-fixada por uma hora neste mesmo tampão contendo tetróxido de ósmio 1%, em seguida, incluída em resina. Todas as seções foram coradas com acetato de uranila a 4% seguido por citrato de chumbo 2,6%, e observadas entre 1000 e 1500 kV em microscópio eletrônico de varredura com filamento de tungstênio Shimadzu-SS550 (Kyoto, Japan) (LOUSSERT et al., 2010).

1.3.9 Estabelecimento de aspergilose pulmonar em modelo animal

1.3.9.1 Animais

O projeto foi submetido a aprovação pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA) do Centro de Biociências (CB) da UFPE, sob o processo de número 23076.032759/2014-87 (Anexo A). Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), do sexo masculino, com peso de 25-30 g, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)/UFPE. Água e ração comercial (Purina, Rio de Janeiro, RJ), foram oferecidas *ad libitum* e os animais mantidos em gaiolas em grupos de seis, em biotério convencional.

1.3.9.2. Regime de imunossupressão

Os animais foram pesados e imunossuprimidos com ciclofosfamida (150 mg/Kg), no primeiro e quarto dias, e tratados com o antibiótico enrofloxacino (5 mL/Kg) por via intraperitoneal para prevenir infecções bacterianas. No quinto dia do experimento foi colhido sangue periférico para realização de hemogramas para confirmar a imunossupressão.

1.3.9.3. Infecção experimental

Dois isolados foram selecionados, de acordo com os resultados de quantificação de biofilme e produção de GT, para estabelecimento do modelo de infecção. Os isolados foram cultivados em SDA, contido em placas de Petri, por cinco dias a 37 °C, e os conídios

coletados pela adição de 3 mL de PBS (pH 7,4) acrescido de 0,2% de Tween 80, de acordo com a metodologia proposta por Gravelat et al. (2008). Os conídios foram concentrados por centrifugação e estabelecido um inóculo de $5x10^5$ conídios/mL. Foram utilizados quatro grupos de animais como explicitado na Tabela 2.

Tabela 2 – Gupos de animais e esquema imunossupressor para estabelecimento de modelo experimental de aspergilose pulmonar

Inóculo	Eutanásia			Esquema imunossupressor
	Grupo 1 (24 h)	Grupo 2 (48 h)	Grupo 3 (72 h)	
Aspergillus fumigatus URM 3812 (ambiental)	6	6	6	Ciclofosfamida + Enrofloxacino
A. fumigatus URM 6573 (clínico)	6	6	6	Ciclofosfamida + Enrofloxacino
PBS	6	6	6	Ciclofosfamida + Enrofloxacino
Controle	6	6	6	PBS

URM= University Recife Mycology (Micoteca URM); h= Horas; PBS= Tampão Fosfato Salina

No quinto dia do experimento, os animais foram anestesiados com uma combinação de quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (2,5 mg/Kg) por via intraperitoneal, então foi administrado um volume de 25 μL por instilação intranasal de inóculo contendo $5x10^5$ conídios/mL. Eutanásia por dose letal combinada de quetamina e xilazina (0,25 mL de quetamina + xilazina na proporção de um para um) por via intraperitoneal ocorreu em 24, 48 e 72 horas após o inóculo.

Para confirmação da infecção, foram coletados fragmentos de pulmão em solução salina (0,85%) esterilizada para exame direto e reisolamento do fungo inoculado. Fragmentos de pulmão foram montados em lâminas e clarificados com Hidróxido de potássio (KOH) a 40%, para posterior observação ao microscópio ótico, e inoculados em SDA acrescido de cloranfenicol (50 mg/L) em duplicata e incubados a temperatura ambiente (± 28 ºC) e a 37 ºC por até sete dias. Para análise anatomopatológica os fragmentos foram preservados em solução de formol a 10% e realizados cortes histológicos corados com hematoxilina eosina (LACAZ et al., 2002).

1.3.10 Análise estatística e apresentação dos dados

Todos os dados apresentados representam as médias e desvio padrão de no mínimo três replicatas biológicas. Para apresentação gráfica e a avaliação estatística dos dados experimentais, dependendo da finalidade do experimento e natureza dos dados, foi realizada análise de variância (ANOVA) e/ou teste de Tukey, para múltiplas comparações. Foi utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., Califórnia, USA). Valores de P (*p*-values) menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPERGILOSE

2.1.1 Breve histórico

A aspergilose em humanos foi, provavelmente, descrita pela primeira vez por Hughes Bennett em 1842 na "*Transactions of the Royal Society of Edinburgh*", entretanto o primeiro caso inquestionável de aspergilose pulmonar humana foi descrito por Sluyter em 1847 em Berlim, em seguida, em 1856, Virchow descreveu mais quatro casos (PEER, 1958).

A França teve destaque na difusão dos conhecimentos sobre Aspergilose, com a publicação do primeiro livro sobre esta micose o *"Etude sur l'Aspergillose"*, publicado em 1897 por Louis Rénon, chefe da *Clinique a la Faculté de Medècine de Paris*. Em seu livro de 300 páginas, a principal preocupação de Rénon era estabelecer se a doença era primária ou secundária, concluindo que poderia ser de ambas as formas e destacando o *A. fumigatus* como agente de maior patogenicidade (RÉNON, 1893).

Entre 1890 e 1897, pesquisas realizadas na França, focaram na aspergilose como doença ocupacional, com especial atenção aos cuidadores de pombos e fabricantes de perucas em Paris. Os cuidadores alimentavam os pombos com uma mistura de água, painço e ervilhaca, a qual colocavam na boca e, em seguida, depositavam-na nos bicos dos animais. Enquanto os fabricantes de perucas utilizavam farinha de centeio para desengordurar os cabelos e, assim, viviam em uma atmosfera repleta de poeira (MACARTNEY, 1964).

Em 1890 no "*International Congress"* em Berlim, Dieulafoy e colaboradores, descreveram pela primeira vez três casos de cuidadores de pombos com sintomas crônicos pulmonares, apresentando tosse produtiva, dispneia e hemoptise, os quais foram associados à aspergilose, devido à ausência do bacilo da tuberculose, e presença de *A. fumigatus* (MACARTNEY, 1964). Foi sugerido pelos autores que os grãos usados para alimentação dos pombos e, conhecidamente, contaminados com grande quantidade de esporos fúngicos, causaram a doença, a qual chamaram de "*Pseudo Tuberculose Mycosique"*. Diversos outros estudos tentaram demonstrar a associação da aspergilose com determinadas profissões, principalmente, aquelas nas quais os trabalhadores estavam expostos à poeira e grãos; entretanto, não foi possível fazer esta associação (DÜNNER *el al.,* 1958; HUNTER; PERRY, 1946; MACARTNEY, 1964).

Na tentativa de minimizar os casos de equívocos no diagnóstico de aspergilose e tuberculose, devido à semelhança compartilhada por estas doenças quanto ao aparecimento de sintomas como hemoptise e tosse produtiva, entre outros, a "*Pathological Society of London*", em 1899, instituiu a "Comissão de Pseudo-tuberculose", cujo relatório recomendou a retirada do termo do dicionário médico e que apenas lesões causadas pelo Bacilo de Koch fossem denominadas de tubérculos. Enquanto que todas as outras lesões pulmonares fossem referidas como "nódulos", criando a categoria de "nódulos aspergilares" (LANCET, 1899 *apud* HOMEI; WORBOYS, 2013).

Em 1928, a aspergilose foi relatada não mais como uma doença secundária à uma patologia pré existente, mas sim como causa de doença pulmonar (WAHL; ERICKSON, 1928).

2.1.2 Patogênese

A aspergilose é adquirida por meio da inalação dos conídios de *Aspergillus* pelo hospedeiro. Estima-se que um indivíduo se expõe constantemente a cerca de 1 a 100 conídios/m^3 de *A. fumigatus* no ar durante o ano (O'GORMAN, 2011). As consequências da inalação dos conídios dependem da interação entre fatores do hospedeiro, como integridade do sistema imunológico, e fatores de virulência do patógeno podendo estes fungos apenas colonizar o trato respiratório do hospedeiro até causar infecção invasiva e fatal (BEN-AMI; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2010; CHOTIRMALL; MCELVANEY, 2014; DAGENAIS; KELLER, 2009).

O pequeno tamanho (2-3 μm de diâmetro) dos conídios permite a passagem fácil pelos mecanismos de defesa da cavidade nasal e do trato respiratório superior até atingirem os alvéolos pulmonares, onde germinam, resultando em uma potencial angioinvasão pelo fungo (BARNES; MARR, 2006; O'GORMAN, 2011).

O tropismo por vasos sanguíneos é uma característica marcante do *A. fumigatus* na infecção. Durante o desenvolvimento no tecido pulmonar, as hifas atravessam a barreira capilar alveolar e penetram nas células endoteliais, chegando ao lúmen das arteríolas pulmonares. Da mesma forma do epitélio pulmonar, as hifas induzem a própria internalização pelas células endoteliais (LOPES-BEZERRA, FILLER, 2004; KAMAI et al., 2006; 2009). Este processo é seguido pela injúria endotelial, liberação de citocinas pró-inflamatórias, expressão de fator endotelial na superfície das células, ativação da cascata de coagulação e trombose intravascular (KAMAI et al., 2006).

Para que todo processo ocorra, é necessário que os conídios superem as primeiras linhas de defesa do hospedeiro, bem como as barreiras físicas e mecânicas, como o *clearence* mucociliar. Tanto a imunidade inata quanto a adquirida têm papel vital na defesa contra *Aspergillus* sp. Quando os conídios chegam aos pulmões ativam as células efetoras da imunidade celular inata, que são competentes em eliminá-los (MARR et al*.,* 2004; CHOTIRMALL; MCELVANEY*,* 2014). Macrófagos alveolares rapidamente fagocitam os conídios, os quais são destruídos no interior dos fagossomos por meio de oxidases dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADPH), gerando espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), presumivelmente, isso ocorre por meio de resposta local de citocinas, pois indivíduos inalam centenas de conídios por dia sem inflamação evidente (PHILIPPE et al., 2003).

Todo o processo se desenvolve devido à exposição de β-glucanos, e possivelmente outras moléculas durante a germinação, que interagem com receptores de reconhecimento, como os receptores "Toll-like" (TLR) e dectina-1, em macrófagos, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (CHOTIRMALL; MCELVANEY*,* 2014; O'GORMAN, 2011), como a interleucina (IL)-17 (HOLLAND; VINH, 2009).

Outra citocina bastante envolvida no processo imunológico contra *A. fumigatus* é a IL-10, cujo papel ainda não foi completamente esclarecido. Um estudo realizado por Roilides et al. (2001) demonstrou que o aumento dos níveis circulantes de IL-10, em pacientes neutropênicos com AI, está relacionado à progressão da doença.

O papel vital dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) é demonstrado em modelos animais, em que coelhos neutropênicos desenvolvem rapidamente doença invasiva. Ademais, em seres humanos, sabe-se que a neutropenia é fator de risco para o desenvolvimento da AI (BARNES; MARR, 2006). Diversos estudos explicam este fato baseados na incapacidade dos macrófagos residentes fagocitarem as hifas, devido ao tamanho. Sendo fundamental a participação dos PMNs, os quais circundam as hifas e liberam substâncias antimicrobianas e intermediários oxigenados reativos (BRUNS et al., 2010a; LEVITZ, 2004; MOMANY; TAYLOR, 2000).

Bonnett et al. (2006) relatam que PMNs também participam na defesa contra os conídios inalados, agregando-se ao redor dos conídios nas vias aéreas e prevenindo a germinação pela liberação de lactoferrina a partir dos grânulos primários. Plaquetas, também, estão envolvidas no processo de degradação dos conídios, as quais se aderem a essas estruturas e liberam serotonina, porém seu papel ainda não está bem estabelecido (PERKHOFER et al*.,* 2008).

Outro mecanismos de defesa do hospedeiro é o sistema complemento, cujas cascatas de reações convergem para a ligação do C3 à superfície de conídios e hifas de *Aspergillus*. Menos moléculas de C3 se ligam à superfície de conídios de *A. fumigatus* e *A. flavus*, o que torna essas espécies menos susceptíveis à fagocitose mediada pela opsonização pelo sistema complemento (BEHNSEN et al*.,* 2010). *A. fumigatus* e *A. flavus*, mas não *A. niger* produzem um fator solúvel inibidor da via alternativa de ativação do complemento (DAGENAIS; KELLER, 2009).

Além do sistema imunológico, as próprias células do epitélio respiratório secretam substâncias como lisozima, lactoferrina, proteínas surfactantes e defensinas, as quais atuam na resistência à infecção por espécies de *Aspergillus,* porém com uma resposta de menores proporções que a dos macrófagos (CHOTIRMALL; MCELVANEY, 2014; DAGENAIS; KELLER, 2009; WRIGHT, 2005; ZAREMBER et al., 2007).

2.1.3 Fatores de Risco

Os fatores predisponentes à aspergilose amplamente conhecidos estão relacionados à terapias imunossupressoras como, corticoterapia, antibioticoterapia, tratamento para o câncer, transplante de órgãos sólidos e transplante de medula óssea (TMO), entre outros (LEWIS et al*.,* 2013; TACCOME et al*.,* 2015).

Além de fatores externos ao hospedeiro, tem sido demonstrada a relação de fatores biológicos e imunogenéticos com a suscetibilidade à aspergilose. Em uma análise multivariada, a idade avançada foi determinada como fator de risco independente para infecções fúngicas invasivas (IFIs) em pacientes que receberam TMO, em contraste com outros fatores biológicos, tais como acidose e hiperglicemia, que não aumentaram o risco (MARR et al*.,* 2002).

Apesar do sexo ainda não ser considerado como um fator predisponente, a maioria dos pacientes com AI, são do sexo masculino; justificando-se pelos hábitos, como tabagismo e etilismo, e ocupação (LEWIS et al*.,* 2013; TACCONE et al*.,* 2015).

A sobrecarga de ferro, desenvolvida durante o tratamento de algumas doenças, tem sido associada ao aumento da suscetibilidade às IFIs em pacientes receptores de TMO (ALTES et al*.,* 2004), com mieloma (MICELI et al*.,* 2006) e leucemia (KONTOYIANNIS et al*.,* 2007). Fato justificado pelos seus efeitos negativos na imunidade celular, além da maior disponibilidade de ferro ao patógeno (ERJAVEC; KLUIN-NELEMANS; VERWEIJ*,* 2009).

Os polimorfismos de base única (SNPs) em genes vinculados à fatores imunológicos estão associados à dimunição, como SNPs no gene promotor da IL-10 (SEO et al., 2005), ou aumento na susceptibilidade à AI, como o polimorfismo no gene do plasminogênio (ZAAS et al., 2008).

As diferenças inter-individuais no risco de pacientes submetidos a regimes de tratamentos imunossupressores similares em desenvolver IFIs podem ser explicadas, em parte, pela variação genética na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, cuja variação na produção, aproximadamente 60%, é determinada geneticamente (SALES, 2009).

Além disso, a produção defeituosa de oxidantes dentro dos agregados de LPMNs (BONNETT et al., 2006, FELDMESSER, 2006), bem como a ausência ou diminuição do sinal por células epiteliais ou fagocíticas, gerados a partir dos TLR2 e TLR4 pode levar a risco aumentado de desenvolver aspergilose (KESH et al., 2005).

2.1.4 Epidemiologia

Desde a década de 90 tem sido mostrada uma mudança na epidemiologia das IFIs, com aumento nos casos de AI. Em um estudo de necropsias, realizado entre 1992 e 2001 em um hospital alemão, a aspergilose representou cerca de 62% dos casos de IFIs, enquanto que a candidíase, 35% dos casos (KOCH; HOHNE; TIETZ, 2004).

As razões desta mudança não são completamente conhecidas, provavelmente, resultam de diversos fatores como o aumento no número de TMO alogênico, aumento do uso de fluconazol na profilaxia destes pacientes, mudanças no tratamento de outros grupos de risco, como o uso de agentes que alteram as funções de constituintes do sistema imunológico e aumento no número de pacientes neutropênicos com doenças hematológicas malignas (LASS-FLÖRL, 2009). As taxas de mortalidade neste grupo de pacientes chegam a 90% do casos (LEWIS et al., 2013; NICOLLE et al., 2011).

A epidemiologia da AI é pobremente documentanda em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), apesar das taxas de mortaliadade se aproximarem a 100% (ALANGADEN, 2011; CORNILLET et al., 2006), bem como em pacientes críticos em Unidade de Tratamento Intensivo com ausência dos fatores de risco clássicos, incluindo pacientes com DPOC, asma, cirrose hepática, tumores sólidos e em uso de corticosteroides, cuja mortalidade chega a 72% (TACCOME et al., 2015).

Além da alta mortalidade, a aspergilose custa milhões ao cofres públicos. No ano de 1996, foram estimadas 10.190 hospitalizações por aspergilose e 1.970 mortes nos EUA, com

tempo médio de permanência hospitalar de 17 dias e custo médio de U$ 62.426 por internação, totalizando U$ 633,1 milhões (ALANGADEN, 2011; DASBACH et al., 2000).

Dentre os agentes etiológicos, *A. fumigatus* é responsável por aproximadamente 90% dos casos de aspergilose; no entanto, o número de outras espécies causando a doença é cada vez maior, incluindo *A. flavus, A. niger, A. terreus, A*. nidulans, *A. ustus* e *A. ochraceus* (ALANGADEN, 2011; BABAMAHMOODI et al., 2015; CAMPS et al., 2012; LAI et al., 2008; LASS-FLÖRL, 2009). *A. fumigatus* foi responsável por 56% dos casos, *A. flavus* 18,7%, *A. terreus* 16%, *A. niger* 8% e *A. versicolor* 1,3% em pacientes após TMO (MORGAN *et* et al., 2005). Esta mudança no espectro microbiológico tem importante repercussão clínica pela resposta limitada que *Aspergillus* não-*fumigatus* podem apresentar a antifúngicos tradicionais (SOUZA, 2006).

Em determinadas localizações geográficas como a Arábia Saudita e Sudão, regiões semi-áridas e áridas, AI causada por *A. flavus* é mais comum que a causada por *A. fumigatus*. Nessas regiões, *A. flavus* é responsável por 44% dos casos de aspergilose cutânea e sinusite, enquanto *A. fumigatus* é responsável por 26% dessas formas clínicas. Entre os casos de ceratite, *A. flavus* foi responsável por 80% do total de infecções. Este fato pode ser devido a capacidade dos esporos de *A. flavus* permanecerem viáveis em áreas muito secas (KRISHNAN; MANAVATHU; CHANDRASEKAR, 2009; YU et al. 2005).

2.1.5 Formas clínicas, diagnóstico e tratamento

A forma mais comumente encontrada de aspergilose é a pulmonar, devido à colonização do trato respiratório por *Aspergillus* spp. (LEWIS et al., 2013).

Alguns critérios vem sendo propostos para diferenciação entre colonização e infecção. É considerada colonização quando ocorre isolamento de *Aspergillus* spp. em 50% ou mais amostras de esputo ao longo de seis meses a um ano; ausência de deterioração da função pulmonar e ausência de aumento de sintomas respiratórios, como a tosse. Diferentemente para infecção, além do isolamento do agente em 50% ou mais das amostras, deve haver declínio dos parâmetros da função pulmonar; exacerbação de sintomas respiratórios, resposta incompleta ou ausente após duas a quatro semanas de tratamento com antibióticos de amplo espectro, bem como ser *Aspergillus* spp. o único organismo isolado de repetidas amostras de esputo (LIU; MODHA; GAILLARD, 2013; WALICKA-SERZYSKO; SANDS, 2015).

A aspergilose pulmonar pode apresentar-se sob três formas anatomo-patológicas principais, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergiloma, conhecido como bola

fúngica e aspergilose invasiva (AI), sendo esta última condição grave, fatal na maioria dos casos (KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011; PEIXINHO et al., 2003).

Apresentações clínicas incomuns incluem lesões na pele (SCHIMMELPFENNIG et al., 2001; TAHIR et al., 2011), osteomielite (GAMALETSOU et al., 2014), rinosinusite (TAMGADGE et al., 2012), endoftalmite (MACHADO et al., 2003), endocardite (KALOKHE et al., 2010), sinusopatia invasiva (BARNES; MARR, 2006) e acometimento do sistema nervoso central (KÖSE et al., 2011). Além destas formas, há aspergilose traqueobrônquica (ATB), uma forma rara que acomete, principalmente, pacientes neutropênicos, portadores da aids e receptores de transplantes de pulmão (KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011).

2.1.5.1 Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA)

A primeira descrição de uma forma alérgica de aspergilose foi em 1887 por Popoff, em uma mulher de 21 anos que apresentava sintomas de asma brônquica (MACARTNEY, 1964). Entretanto, os primeiros casos comprovados de ABPA foram descritos em 1952 por Hinson, Moon e Plummer, em portadores de asma brônquica.

A ABPA é resultante da hipersensibilidade a antígenos de *Aspergillus*, encontrado colonizando as vias aéreas. Esta forma comumente ocorre em pacientes com asma, fibrose cística (FC) e bronquiectasia (BARNES; MARR, 2006; GOLDENBERG; NICHOLAS, 2008; SALES, 2009; WALSH et al., 2008).

Aproximadamente, 7% a 14% dos pacientes asmáticos corticoide-dependentes, bem como 6% dos portadores de FC apresentam ABPA (LOPES et al., 2004). Estima-se que, aproximadamente, 4,8 milhões de pacientes adultos asmáticos têm ABPA; no Brasil, esse número pode chegar a mais de 480 mil pacientes (DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013). Apesar das investigações realizadas, a prevalência da ABPA permanece especulativa, uma vez que até 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda não a reconhece como doença na Classificação Internacional de Doenças (CID-10) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao desenvolvimento de ABPA ainda são pouco compreendidos, mas compartilham claramente mecanismos imunológicos e genéticos importantes, além da colonização pelo *Aspergillus* (KNUTSEN; BELLONE; KAUFFMAN, 2002; KNUTSEN et al., 2006; RAPAKA; KOLLS, 2009). Acredita-se que características únicas deste fungo, associadas a fatores genéticos e ambientais facilitam a colonização

crônica e o desenvolvimento de resposta imunológica exacerbada, levando a remodelação irreversível das vias aéreas, associada à fibrose, obstrução pulmonar e bronquiectasias (HILVERING et al., 2011).

A suspeita de ABPA advem, geralmente, por razões clínicas como, febre baixa, tosse produtiva, sibilos, dispnéia, cansaço, hemoptise e espectoração de tampões mucosos acastanhados. Entretanto, às vezes os pacientes são assintomáticos e diagnosticados durante os testes de rotina em indivíduos com asma ou FC. O diagnóstico é realizado pelos achados radiológicos associados a testes sorológicos (GOLDENBERG; NICHOLAS, 2008; HILVERING et al., 2011).

As radiografias de tórax podem se apresentar sem alterações nos estágios iniciais da doença. Durante as exacerbações agudas, infiltrados pulmonares são característicos da doença, os quais tendem a localizar-se nos lobos superiores. A tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) é útil para uma melhor definição de bronquiectasia. Tipicamente, IgE sérica total é elevada e é possível isolar de amostras de esputo espécies de *Aspergillus,* além da reatividade imediata à antígenos de *Aspergillus* nos testes cutâneos (BARNES; MARR, 2006; WALSH et al., 2008; SALES, 2009).

Diversos critérios para diagnóstico de ABPA tem sido propostos. Em 2003, foi elaborado um consenso internacional para diagnóstico em pacientes com FC (STEVENS et al., 2003), com base em um clássico caso de ABPA; em 2012, a partir de extensa revisão de literatura, foram propostos critérios que abrangem tanto pacientes com asma quanto aqueles com FC (KNUTSEN et al., 2012), enquanto que em 2013, pesquisadores do grupo de trabalho de "ABPA em asmáticos" formado pela *International Society of Human and Animal Mycology* (ISHAM) propuseram novos critérios de forma a facilitar o diagnóstico e pesquisa clínica de pacientes com ABPA, entretanto, estes autores afirmam que ainda é necessária validação e refinamento futuro para estes critérios (AGARWAL et al., 2013). Os critérios propostos para diagnóstico de ABPA por estes grupos de pesquisa estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Critérios para diagnóstico de Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA) em pacientes com asma e fibrose cística, segundo consensos de 2003, 2012 e 2013.

2003 (Stevens et al., 2003)	**2012** (Knutsen et al., 2012)	**2013** (Agarwal et al., 2013)
1- Deterioração clínica aguda ou subaguda (aumento da tosse, chiado, intolerância a exercícios, asma induzida por exercícios, mudanças na função pulmonar e aumento na produção de expectoração) que não seja atribuída a outras etiologias; **2-** IgE sérica total de 1500 UI/mL (1200 ng/mL)[a]; **3-** Reatividade cutânea imediata a *Aspergillus* spp. (*prick-test* com pápula > 3 mm de diâmetro com eritema circundante, na ausência de tratamento anti-histamínico sistêmico) ou presença de IgE anti-*A. fumigatus in vitro*; **4-** Um dos critérios seguintes: (a) detecção *in vitro* de preciptinas anti-*A. fumigatus* ou IgG anti-*A. fumigatus;* ou (b) anormalidades novas ou recentes na radiografia de tórax (infiltrados ou tampões mucosos) ou tomografia computadorizada de tórax (bronquiectasias) que não tenham desaparecido com antibióticos e fisioterapia padrão.	**1-** Asma ou FC, com deterioração da função pulmonar; **2-** Reatividade imediata a espécies de *Aspergillus* em testes cutâneos (*prick-test*); **3-** Nível sérico de IgE total igual ou maior que 1000 ng/mL (416 UI/mL); **4-** Aumento de IgE e IgG anti-*Aspergillus* espécie-específico; **5-** Inflitrado pulmonar na radiografia de tórax. "Critérios adicionais podem incluir eosinophilia no sangue periférico, presença de preciptinas séricas anti-*Aspergillus* spp., bronquiectasia central e tampões de muco contento espécies de *Aspergillus*".	**Condição predisponente:** Asma brônquica, fibrose cística **Critérios obrigatorios** (ambos devem estar presentes): **1-** Reatividade cutânea imediata a *Aspergillus* spp. (prick-test positivo) ou níveis elevados de IgE anti-*A. fumigatus*; **2-** Nível elevado de IgE total (>1000 UI/mL)[b]. **Outros critérios** (ao menos dois devem estar presentes): **1-** Presença de preciptinas ou IgG anti-*A. fumigatus* no soro; **2-** Opacidade pulmonar radiográfica compatível com ABPA[c]; **3-** Contagem de eosinófilos totais > 500 cells/μL em pacitentes que nunca fizeram uso de esteroides.

[a] Se há suspeita de ABPA e o nível de IgE total é de 200-500 UI/mL, recomenda-se repetir o teste em 1-3 meses. Se o paciente fizer uso de corticoides, repetir o teste quando o tratamento for interrompido.
[b] Se o paciente cumprir todos os outros critérios, o nível de IgE < 1000 UI/mL pode ser aceito.
[c] Os aspectos radiográficos consistentes com ABPA podem ser transitórios (exemplo: consolidação, nódulos, opacidades, sinal em "dedo de luva", entre outros) ou permanentes (bronquiectasias, fibrose pleuropulmonar).

O tratamento da ABPA tem quatro objetivos principais, são eles: (I) controle dos sintomas da asma ou FC; (II) prevenir ou tratar as exacerbações pulmonares da ABPA; (III) redução ou remissão da inflamação pulmonar; e (IV)- mitigar a progressão para fibrose ou doença cavitária (GREENBERGER et al., 2014).

Corticosteróides orais representam o principal tratamento da ABPA. No entanto poucos dados estão disponíveis para orientar a dose ou duração do tratamento. Baixas doses de corticosteróides sem tratamento antifúngico (0,5 mg/kg/dia por 1-2 semanas seguidas, e em dias alternados durante 6-8 semanas, seguida de diminuição e descontinuação) estão

associadas a 45% mais recaídas e subsequente dependência de corticosteróide oral (GREENBERGER et al., 2002). Uma dosagem mais elevada de corticosteróides por mais tempo (0,75 mg/kg, durante 6 semanas, de 0,5 mg/kg, durante 6 semanas, então diminuídas para 5 mg a cada 6 semanas, continuada por um total de, pelo menos, 6 semanas) foi associada a uma taxa de remissão mais elevada e uma menor prevalência de ABPA corticosteróide-dependente (13,5%) (AGARWAL et al., 2006). Um estudo controlado randomizado para avaliação de dois diferentes regimes de dose de glicocorticóides para ABPA foi concluido (clinicaltrials.gov; NCT00974766), entretanto seus resultados ainda não estão disponíveis.

Tem sido demonstrada a eficácia do tratamento quando são associados corticosteróides com antifúngicos como itraconazol e voriconazol (PASQUALOTTO et al., 2009), sendo os antifúngicos responsáveis pela diminuição da dose de corticoide necessária, a eosinofilia e a concentração de IgE, melhorando a função pulmonar e a qualidade de vida. Existe a recomendação de duração da terapia por 6-8 meses com antifúgicos. Apesar destas evidências, a dose, frequência e duração da terapia, permanecem mal definidas, sendo necessários mais estudos (PARULEKAR; DIAMANT; HANANIA, 2015).

A detecção precoce e tratamento da ABPA antes do desenvolvimento de todos os sintomas clínicos e bronquiectasia é primordial, uma vez que o adiamento do tratamento pode resultar em danos pulmonares irreversíveis como fibrose pulmonar (AGARWAL et al., 2013; GREENBERGER et al., 2014).

2.1.5.2 Aspergiloma

Aspergiloma é a mais comum e mais reconhecida forma de comprometimento pulmonar relacionada a *Aspergillus* spp., comumente conhecida como bola fúngica. O aspergiloma é considerada como forma sapróbia devido ao desenvolvimento em uma cavidade pré-existente no pulmão, a qual não apresenta danos aparentes. A bola fúngica é composta por hifas, células inflamatórias, fibrina, muco e fragmentos de tecido. Diversas doenças pulmonares cavitárias como tuberculose, bronquiectasias, sarcoidose, cistos brônquicos, neoplasias e infecções pulmonares, são agravadas pelo aspergiloma. Destas, a tuberculose é a condição mais comumente associada (KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011; MOODLEY; PILLAY; DHEDA, 2014; RUIZ JÚNIOR et al., 2010).

A bola fúngica pode mover-se dentro da cavidade, porém comumente não invade o parênquima pulmonar circundante ou vasos sanguíneos, embora existam exceções

(RAFFERTY et al.,1983; TOMEE et al., 1995). Na maioria dos casos, a lesão permanece inalterada, mas em 10% dos casos, o aspergiloma pode diminuir de tamanho ou regredir espontaneamente, sem tratamento. Uma vez estabelecido, o aspergiloma raramente aumenta de tamanho (GEFTER, 1992).

A maioria dos pacientes com aspergiloma são assintomáticos e quando os sintomas estão presentes, os pacientes apresentam hemoptise leve, mas hemoptise grave e potencialmente fatal pode ocorrer particularmente em pacientes com sangramento decorrente de tuberculose (FAULKNER et al., 1978). Esse fato pode ocorrer devido à invasão de vasos sanguíneos, endotoxinas e enzimas proteolíticas liberadas pelo fungo, irritação mecânica dos vasos expostos dentro da cavidade pela movimentação da bola fúngica ou infecção aguda bacteriana associada (JEWKES et al., 1983; LEE, J. et al., 2004; LEE, S., 2009; PIMENTEL, 1966). Menos comumente, os pacientes podem desenvolver tosse e dispneia que estão, provavelmente, mais relacionadas à doença pulmonar subjacente; e febre, que pode ser secundária à doença de base ou superinfecção bacteriana da cavidade. A taxa de mortalidade relacionada com aspergiloma varia de 2% a 14% (KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011; ZMEILI; SOUBANI, 2007).

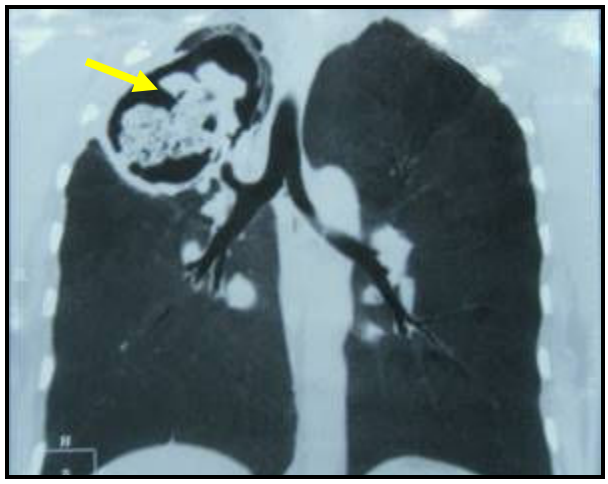
O aspergiloma pulmonar foi classificado por Belcher e Plummer em 1960 em simples e complexo, e esta divisão tem sido importante para a compreensão desta forma clínica, para melhor manejo e tratamento dos pacientes (MOODLEY et al., 2014). O aspergiloma simples se desenvolve em uma cavidade com paredes finas e apresenta parênquima pulmonar adjacente normal, o processo da doença é mais localizado e a pleura não é envolvida no processo patológico (BELCHER; PLUMMER, 1960; DENNING et al., 2003; MOODLEY et al., 2014; RUIZ JÚNIOR et al., 2010; UNIS; PICON; SEVERO, 2005).

Diferentemente do que ocorre no aspergiloma simples, na sua forma complexa, o processo patológico é muito mais agressivo e difuso; há grave destruição do parênquima e, na maioria dos casos, a pleura adjacente também está envolvida na patologia. Neste caso, acredita-se que o *Aspergillus* encontra-se apenas colonizando o tecido destruído. A destruição e patologia pulmonar e pleural observadas são devidas, geralmente, a processos de doenças pré-existentes, mais comumente a tuberculose (MOHAPATRA et al., 2016; RUIZ JÚNIOR et al., 2010). Os pacientes podem apresentar diminuição da função pulmonar; as cavidades formadas apresentam paredes espessas, devido a repetidas infecções. Pode, também, haver doença pulmonar generalizada, chegando a exibir dano bilateral (MOODLEY et al., 2014).

O diagnóstico de aspergiloma é realizado, geralmente, com base nas características clínicas e radiológicas, combinadas à evidências sorológicas ou microbiológicas. Nas

radiografias, o aspergiloma pulmonar aparece como uma massa sólida arredondada, por vezes móvel, de densidade similar a da água, dentro de uma cavidade esférica ou oval, e separada da parede da cavidade por um espaço aéreo de tamanho e forma variáveis (STEVENS et al., 2000). A TCAR pode ser necessária para visualizar a bola fúngica, a qual não é aparente na radiografia de tórax (Figura 1). Esta aparência radiológica pode ser observada em outras condições diferentes tais como neoplasias, abscesso e cisto hidático; podendo o aspergiloma coexistir com qualquer uma dessas condições (MOODLEY et al., 2014; ZMEILI; SOUBANI, 2007). Quando a cavidade é muito maior do que a aspergiloma, a massa fúngica pode ser móvel e assume posições diferentes na cavidade dependendo da mudança de posição do paciente (MOODLEY et al., 2014).

Figura 1 – Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (TCAR) de pulmão evidenciando a presença de massa sólida no interior de uma cavidade oval localizada no lobo superior direito (seta amarela).



Fonte: Brandão, 2012.

Culturas de esputo com isolamento do agente etiológico ocorrem em apenas 50% dos casos. Testes sorológicos para pesquisa de antígenos e anticorpos se apresenttam positivos em quase todos os casos, chegando a apresentar sensibilidade maior que 95% (BARNES; MARR, 2006; LOPES et al., 2004; STEVENS et al., 2000). Alguns autores discutem a mudança na terminologia de aspergiloma para aspergilose semi-invasiva, quando em testes para pesquisa de anticorpos, são detectadas precipitinas no soro de pacientes; no entanto, um consenso ainda não foi estabelecido (BARNES; MARR, 2006; GOLDENBERG; NICHOLAS, 2008).

Fatores de risco que incorrem em um mau prognóstico e incluem a severidade da doença de base, aumento no tamanho ou no número das lesões vistas na radiografia de tórax, grau de imunossupressão (incluindo corticoterapia e infecção pelo HIV), aumento nos títulos de IgG anti-*Aspergillus*, hemoptise em grande volume e recorrente, e sarcoidose (STEVENS et al., 2000).

Não há consenso sobre o tratamento de aspergiloma, permanecendo controverso, devido, principalmente, à variabilidade de doenças de bases que podem ser apresentadas pelos pacientes. Assim, uma estratégia ótima de tratamento, ainda permanece desconhecida (MOODLEY et al., 2014). Geralmente, o tratamento é considerado apenas quando os pacientes se tornam sintomáticos, geralmente com hemoptise (KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011).

Embora amplamente utilizada, a terapia antifúngica é, frequentemente ineficaz. No entanto, a administração de anfotericina B por via percutânea guiada por TCAR vem se mostrando eficiente dentro de poucos dias, especialmente em pacientes com hemoptise maciça (KLEIN; FANG; CHANG, 1933; LEE et al., 1993). O papel da anfotericina B administrada por via intravenosa é incerto, e não se consegiu demonstrar seus benefícios (HAMMERMAN; SAROSI; TOSH, 1974). Um estudo utilizando instilação endobrônquica ou intracavitária de anfotericina B em pacientes com aspergiloma foi particularmente promissor: 12 de 14 pacientes alcançaram cura ou melhora clínica (YAMADA et al., 1993). Kravitz et al. (2013), avaliaram, retrospectivamente, os resultados em 20 pacientes após a instilação intracavitária percutânea de anfotericina B. A maioria dos pacientes não apresentou hemoptise persistente durante um mês de acompanhamento após o procedimento, apesar de 30% ter apresentado, eventualmente, recorrência da hemoptise grave. Pneumotórax ocorreu em 26% dos pacientes, porém sem sequelas graves.

Ressecção cirúrgica, até o momento, é a única forma definitiva de tratamento; envolvendo, geralmente, lobectomia e, assim, remoção da bola fúngica. Tal procedimento é indicada para pacientes com hemoptise recorrente, caso a função pulmonar seja suficiente para permitir a cirurgia. No entanto, não há consenso sobre qual tipo de cirurgia e momento clínico ideal para sua realização (MOODLEY et al., 2014; KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011).

A indicação da ressecção pulmonar para tratamento do aspergiloma pulmonar deve levar em conta o risco da doença e do procedimento cirúrgico. Pacientes com elevado risco operatório, com lesões em ambos os pulmões e com comprometimento da função pulmonar podem ser tratados com procedimentos menos agressivos, como a cavernostomia, a instilação

de antifúngicos diretamente sobre a bola fúngica por via transtorácica e a embolização arterial para o controle da hemoptise (MOHAPATRA et al.,2016; RUIZ JÚNIOR et al., 2010).

Os índices de mortalidade relatados após a intervenção cirúrgica são variáveis (1,17% a 22,6%) (CHEN; JIANG; DING, 2012; DALY et al., 1986; FARID et al., 2013), e estão relacionados à severidade da doença de base como pneumonia, infarto agudo do miocárdio, hemorragia, fístula broncoalveolar, empiema e parada respiratória (DENNING et al., 2003; RUIZ JÚNIOR et al., 2010; FARID et al., 2013).

É fundamental o cuidado na escolha e adaptação dos métodos, entre os diversos procedimentos disponíveis, de acordo com as características específicas de cada paciente (CHEN; JIANG; DING, 2012; MOODLEY et al., 2014).

2.1.5.3 Aspergilose Invasiva (AI)

O primeiro caso relatado foi em 1953 por Rankin. A aspergilose invasiva (AI) é uma das formas mais comuns da doença e, seu início dá-se, mais frequentemente, pelo trato respiratório inferior, pela inalação dos conídios e, menos comumente, pode iniciar-se em locais além dos pulmões, como seios paranasais, trato gastrointestinal ou pele por meio de cateter intravenoso, prolongado contato da pele com fitas adesivas ou queimaduras. A aspergilose pode difundir-se por via hematogênica para outros órgãos, sobretudo o cérebro, levando a convulsões, infartos cerebrais, hemorragia intracraniana, meningite e abscesso epidural e, menos freqüentemente para pele, rins, pleura, coração, esôfago e fígado (BARNES; MARR, 2006; SHERIF; SEGAL, 2010; TORRELO et al., 2007; WALSH et al., 2008; ZMEILI; SOUBANI, 2007).

Os sintomas são normalmente inespecíficos, e consistentes com broncopneumonia, febre que não responde aos antibióticos, tosse produtiva e dispneia. Os pacientes podem também apresentar dor pleurítica, devido à invasão vascular pulmonar levando a pequenos infartos, e hemoptise, que é geralmente leve, mas podendo apresentar-se de forma grave em alguns pacientes. AI é uma das causas mais comuns de hemoptise em pacientes neutropênicos (PATTERSON; STREK, 2014; SHERIF; SEGAL, 2010).

O diagnóstico precoce pode ser dificultado devido às características clínicas inespecíficas e ausência de febre, principalmente em pacientes fazendo uso de corticosteróides. Além disso, a cultura de lavado broncoalveolar (LBA) e esputo apresenta uma sensibilidade de 50% e o diagnóstico definitivo é realizado apenas em material obtido por biópsia, a qual demonstra evidências histológicas da invasão fúngica no tecido, ou

isolamento do fungo em cultura (BARNES; MARR, 2006; SALES, 2009; WALSH et al., 2008).

As radiografias torácicas podem ser utilizadas como ferramentas diagnósticas, sendo a TCAR um exame que proporciona melhor padrão de imagens, as quais se mostram alteradas antes mesmo do início dos achados clínicos. Múltiplos infiltrados ou nódulos discretos podem ser características iniciais da doença. Uma zona opaca pode se desenvolver ao redor dos nódulos ("sinal do halo"), particularmente em pacientes neutropênicos. Se não tratadas, essas lesões podem evoluir com cavitação ("sinal do crescente aéreo"), no entanto, a administração de terapia empírica torna raros esses achados radiológicos (BARNES; MARR, 2006; SALES, 2009).

A aspergilose invasiva aguda é fatal e o tratamento deve ser iniciado imediatamente. Na prática, a terapia antifúngica muitas vezes é iniciada empiricamente em pacientes neutropênicos que não respondem à terapia com antibióticos de largo espectro. O tratamento com anfotericina B, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anidulafungina pode ser eficaz. Melhoria na neutropenia e redução de imunossupressão aumentam a taxa de sucesso do tratamento (BARNES; MARR, 2006; GOLDENBERG; NICHOLAS, 2008; SHERIF; SEGAL, 2010).

2.1.6 Modelos experimentais de aspergilose

Embora tenha havido progresso no entendimento das formas clínicas, de como o hospedeiro detecta a presença de propágulos fúngicos e mobiliza a resposta imunológica, ainda é escasso o conhecimento sobre as modificações que as espécies de *Aspergillus* sofrem em resposta ao ataque do sistema imunológico; e apesar de alguns genes, como aqueles codificadores de metabólitos secundários e o *RodA*, envolvido na evasão do *A. fumigatus* frente às células do sistema imunológico do hospedeiro, terem sido relacionados à virulência deste fungo, pouco é conhecido sobre as exigências metabólicas ou os mecanismos compensatórios de defesa que permitem sua sobrevivência no interior do hospedeiro (AIMANIANDA et al., 2009; BRUNS et al., 2010a; SUGUI et al., 2008).

Modelos animais de AI são de valor irrefutável para a avaliação das vias de transmissão, resposta imunológica do hospedeiro, patogênese da doença, bem como para o estudo de novos métodos diagnósticos e novas terapias (SHEPPARD et al., 2004a; VALLOR et al., 2008; ZHAO et al., 2010).

No entanto, apesar da existência de diversos estudos, a dificuldade de estabelecer padrões reprodutíveis de AI persiste devido à existência de alguns critérios, os quais devem ser analisados com extrema cautela, sendo a escolha do animal de extrema importância, devendo reproduzir o quadro clínico da doença tão bem quanto possível. Uma grande variedade de modelos experimentais de AI tem sido descrita em camundongos, ratos, coelhos e porquinhos-da-índia; além disso, diversas vias de infecção vêm sendo testadas como intravenosa, intranasal, intratraqueal e por inalação (CLEMONS; STEVENS, 2005; SHEPPARD et al., 2004a; STEPHENS-ROMERO; MEDNICK; FELDMESSER, 2005; VALLOR et al., 2008; ZHAO et al., 2010).

Vários foram os modelos animais de aspergilose desenvolvidos. Sendo uma doença pulmonar importante nas aves, os modelos aviários foram utilizados com êxito para estudar vacinas preventivas. Estudos feitos para simular as doenças humanas têm contado com modelos utilizando espécies de animais comuns de laboratório. Modelos utilizando porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) foram usados principalmente em estudos terapêuticos de AI. Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) foram utilizados para estudar a AI e aspergilose disseminada, assim como ceratite fúngica. Modelos utilizando roedores, particularmente ratos wistar (*Rattus norvegicus*), predominam como a escolha para a maioria dos pesquisadores. A disponibilidade de linhagens de camundongos geneticamente definidas, reagentes imunológicos, custo e facilidade de manuseio são fatores importantes, sendo utilizados animais imunocompetentes e imunossuprimidos (CLEMONS; STEVENS, 2005).

Sheppard et al. (2004a), desenvolveram um método facilmente reprodutível de infecção pela inalação de aerossóis de conídios em ratos imunossuprimidos, dentro de uma câmara acrílica. A utilidade e reprodutibilidade de modelos de infecção com aerossóis de *A. fumigatus* para aspergilose pulmonar vêm sendo avaliada há anos. Estes modelos são amplamente utilizados para o estudo de vários aspectos da patogênese, resposta imunológica inata do hospedeiro, transmissão de doenças adquiridas e terapia (CLEMONS, STEVENS, 2005; MUHAMMED et al., 2012).

No planejamento do modelo experimental outra questão a ser avaliada é o regime de imunossupressão dos animais. Balloy et al. (2005) destacam a importância deste parâmetro, comparando as respostas pulmonares do hospedeiro e desenvolvimento de AI em camundongos infectados com o mesmo inóculo e em estado de imunidade modificada por tratamento com corticosteróide ou um agente quimioterápico. De acordo com os autores, pacientes recebendo corticosteróides para a prevenção ou tratamento da rejeição após o transplante e os que recebem quimioterapia mielotóxica contra o câncer estão em maior risco

de desenvolver AI. Tal como nos seres humanos, os ratos tratados com quimioterapia foram mais sensíveis ao *A. fumigatus* que os tratados com corticosteroides, o que indica claramente que a patogênese da infecção varia de acordo com o tipo de imunossupressão, o desenvolvimento do fungo ou o grau de resposta do sistema imunológico do hospedeiro.

Os modelos têm grande importância para a determinação da eficácia de terapêuticas experimentais, comparção da virulência de diferentes isolados de *Aspergillus*, definição de genes envolvidos na virulência e susceptibilidade à infecção. Adicionalmente, estes modelos têm sido fundamentais para o avanço da terapia antifúngica e compreensão da patogênese e resistência do hospedeiro, havendo um grande potencial para identificação de novas estratégias de diagnóstico e terapêutica, criticamente necessários para a aspergilose, cujo curso muitas vezes é letal (CLEMONS, STEVENS, 2005; MUHAMMED et al., 2012; PATTERSON, 2005; SCHUMANN et al., 2010; SUGUI et al., 2008).

2.2 *ASPERGILLUS* (Micheli ex Link 1809)

O nome *Aspergillus* foi citado em 1729 por Micheli, o qual observando as estruturas de reprodução assexuada deste fungo comparou-o ao "asperges", instrumento utilizado pelo clero católico romano para aspergir água benta nos fiéis (AINSWORTH, 1976). O gênero *Aspergillus* é composto por espécies que habitam principalmente o solo e matéria orgânica morta, estando seus esporos presentes nas correntes de ar de qualquer ambiente, disseminando-se a pequenas e grandes distâncias, e germinam em quase todos os substratos, dependendo das condições ambientais, sendo "onipresente" o adjetivo mais comumente utilizado para descrevê-lo (BENNET, 2010).

O conidióforo é a característica fundamental que define o gênero *Aspergillus*. Durante a diferenciação micelial, algumas células se especializam tornando a parede celular mais espessa tomando uma forma que lembra a letra "T" ou "L", tais células são chamadas de "células pé"; a partir destas, é formado um conidióforo simples perpendicular ao eixo da célula. No ápice do conidióforo ocorre um aumento de tamanho da célula, dando origem a uma vesícula, que pode ser elipsóide ou globosa; a área fértil da vesícula dá origem a células conidiogênicas, denominadas fiálides, as quais originam longas cadeias de esporos mitóticos ou conídios. Em muitas espécies, entre a vesícula e as fiálides encontram-se células denominadas métulas. As cabeças conidiais que apresentam apenas fiálides denominam-se

unisseriadas, e as que apresentam fiálides e métulas, bisseriadas (ABARCA, 2000; BENNETT, 2010; RAPPER; FENNEL, 1977).

A partir de observações realizadas neste gênero um importante marco na Micologia foi constatado, quando, em 1854, Derbay tornou-se o primeiro pesquisador a notar que o micélio de *Aspergillus* era capaz de produzir, além da estrutura de reprodução assexuada, conidióforo característico do gênero, também originava uma estrutura de reprodução sexuada denominada cleistotécio. Esta observação foi de grande relevância, visto que esta estrutura de reprodução havia sido observada em outro organismo, e possuia seu próprio nome *Eurotium herbariorum.* Derbay percebeu que *E. herbariorum* e *A. glaucus* eram as diferentes fases de reprodução de um mesmo organismo. Desde esta observação, várias outras espécies de fungos pertencentes ou não ao gênero *Aspergillus* foram nomeadas com base na fase anamórfica e depois relacionados ao seu teleomorfo (BENNETT, 2010).

Os teleomorfos de *Aspergillus* se incluem nos gêneros *Chaetosartorya, Dichlaena, Emericella, Eurotium, Fennellia, Neosartorya, Petromyces, Stilbothamnium*, *Neopetromyces* e *Neocarpenteles.* Estes estados teleomórficos pertencem ao filo *Ascomycota,* ordem *Eurotiales* e família *Trichomaceae*, porém muitas espécies de *Aspergillus* permanecem não relacionadas a teleomorfos, o que faz com que se pense que a evolução deste gênero destina-se a produção de apenas formas anamórficas, entretanto o curso e velocidade desta evolução não são conhecidos (ABARCA, 2000; FRISVAD; SAMSON, 2000; GUGNANI, 2003; PITT; SAMSON, 2007; SAMSON et al., 2014; UDAGAWA; UCHIYAMA, 2002).

Tradicionalmente, fungos filamentosos têm sido identificados de acordo com a morfologia apresentada, uma espécie é reconhecida como um grupo de isolados que compartilham uma série de características morfológicas que os distingue de outros isolados. Assim, a identificação de *Aspergillus* é baseada na avaliação de sua macromorfologia e micromorfologia: coloração da colônia, pigmentação do meio, taxa de crescimento micelial, textura da colônia e estruturas produtoras de esporos (BALAJEE et al*.,* 2007a; BALAJEE, MARR, 2006).

Dado que poucas espécies deste gênero apresentam reprodução sexual, produzindo ascocarpos com ascos e ascosporos, a identificação microscópica é baseada na morfologia de estruturas reprodutivas assexuais pela observação de características como tamanho e forma da cabeça conidial, vesícula, arranjo dos conídios no exterior da vesícula, presença e forma de fiálides unisseriadas ou bisseriadas, além do tamanho, ornamentação, forma e coloração dos conídios (BALAJEE et al*.,* 2007a; BALAJEE, MARR, 2006).

Com o objetivo de orientar a identificação, várias chaves de identificação baseadas na morfologia foram publicadas (KLICH, 2002) e um tutorial *on-line* é oferecido no website da *"*Schimmelcultures voor Centraalbureau" (CBS, 2011), além de diversos eventos voltados para a capacitação profissional na identificação de espécies do gênero.

O gênero foi dividido originalmente em subgêneros e grupos por Rapper e Fennell em 1965 (BALAJEE et al*.,* 2007a), mas a atual classificação em conformidade com as regras do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas, substituindo a designação de "grupo" por "seção" foi realizada apenas em 1986 por Gams e colaboradores (BENNETT, 2010; SAMSON et al., 2014).

A partir de uma abordagem polifásica, o gênero foi classficado dentro da família *Aspergillaceae*, ordem *Eurotiales*, classe *Eurotiomycetes* e filo *Ascomycota* (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011). Atualmente, o gênero é dividido em quatro subgêneros (*Aspergillus, Circumdati, Fumigati* e *Nidulantes*) e 20 seções (HOUBRAKEN; VRIES; SAMSON, 2014). Há aproximadamente 339 espécies incluídas nesse gênero, sendo esse número suscetível a aumentar devido a pesquisas com abordagem polifásica, levando em consideração não apenas características morfológicas, mas baseando-se em análises de extrólitos e abordagens filogenéticas (SAMSON et al*.,* 2014).

Apesar de ser amplamente utilizada, a identificação morfológica de espécies de *Aspergillus* apresenta diversas limitações, pois desde 1965, Raper e Fennell observaram que "no estudo do gênero *Aspergillus*, é importante perceber que as cepas podem variar dentro de uma espécie, que as espécies podem variar dentro de um grupo e que os grupos se sobrepõem dentro do gênero". Vários estudos têm colocado em foco as dificuldades de métodos de identificação fenotípica deste gênero (BALAJEE et al*.,* 2005a,b; BALAJEE; MARR*,* 2006; HONG et al*.,* 2006a,b).

As dificuldades na identificação incluem a dependência de características instáveis como a cor da colônia, que são dependentes das condições ambientais, como a composição dos meios de cultura, temperatura de incubação e idade das colônias; dependência de características variáveis como forma da cabeça conidial e do arranjo das células conidiogênicas que tendem a modificar-se com a idade da colônia; dependência de características fenotípicas transitórias, tais como formação de ascosporos; produção de fenótipos atípicos pelas cepas isoladas de espécimes clínicos, como esporulação lenta, formação de conidióforos atípicos e conídios albinos; semelhanças morfológicas apresentadas por diferentes representantes da mesma seção; e, finalmente, a identificação fenotípica requer

uma ampla gama de técnicas laboratoriais e profissionais especialmente treinados para esta atividade (BALAJEE; MARR, 2006; BALAJEE et al*.,* 2007a).

Embora existam dificuldades, aproximadamente 89% dos laboratórios de Micologia usam métodos morfológicos para identificação das espécies (MCCLENNY, 2005). Devido à dependência destes laboratórios, diversos autores discutem a necessidade de emprego de técnicas e meios de cultura padronizados, além da exploração de outros marcadores fenotípicos, tais como termotolerância e, principalmente, a formação contínua de profissionais para atuar nessa área, o que garantiria maior credibilidade na identificação. Entretanto, estudos taxonômicos utilizando perfil metabólico e comparações filogenéticas têm enfatizado que a identificação morfológica não separa adequadamente os organismos que são geneticamente distintos (BALAJEE et al*.,* 2005a,b; BALAJEE; MARR*,* 2006; HONG et al*.,* 2006a,b).

A abordagem polifásica para a identificação de espécies de *Aspergillus* constitui-se como padrão ouro, porém torna-se difícil definir um conjunto padrão de critérios que devem ser utilizados. Características morfológicas são, por vezes, variáveis e necessitam da combinação com outros fatores, como análise molecular, fisiologia e dados ecológicos. Apesar de largamente utilizada para identificação de isolados de *Aspergillus*, a região ITS (espaçadores transcritos internos / *internal transcribed spacer*) apresenta pouca ou nenhuma variação entre espécies estreitamente relacionadas, apresentando baixa sensibilidade para distinguí-las dentro das seções. Tendo em vista as limitações das regiões ITS, é recomendada a análise de regiões que codificam ß-tubulina, calmodulina, actina e hidrofobinas, as quais se mostraram eficientes para separação das espécies (BALAJEE et al*.,* 2007a; HOUBRAKEN; SAMSON, 2011; PITT; SAMSON, 2007; SAMSON et al*.,* 2007c).

A importância de um consenso e da combinação de diferentes técnicas é essencial à identificação rápida e confiável em nível de espécie dos fungos deste gênero recuperados de amostras clínicas, para fins epidemiológicos, como vigilância de novas espécies emergentes; além de orientar a terapia antifúngica, visto que algumas espécies de *Aspergillus* podem apresentar maior virulência e resposta distinta à terapia antifúngica (ABAD et al*.,* 2010; ABARCA, 2000; BALAJEE et al. 2007a,b; SHERIF; SEGAL, 2010), como tem-se demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, que isolados de *A. terreus* são, em sua maioria, resistentes a anfotericina B; isolados de *A. ustus* parecem ser refratários aos azóis, e *A. lentulus* possuem baixa suscetibilidade *in vitro* a uma ampla gama de antifúngicos, incluindo anfotericina B, azóis, e equinocandinas (BALAJEE et al*.,* 2005a,b).

2.2.1 *Aspergillus fumigatus* (Fresenius 1863)

Em 1863, *Aspergillus fumigatus* foi descrito pela primeira vez por Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius (SCHMIDT; SCHMIDT, 1999). Atualmente, com base nas características morfológicas, os membros do compexo *A. fumigatus,* pertencem ao subgênero Fumigati, seção Fumigati (BALAJEE; MARR, 2006; PITT; SAMSOM, 2007; SAMSOM et al., 2007a,b,c). Apresentam colônias de crescimento rápido (5-7 cm após 10 dias a 28 °C), no início do desenvolvimento, em meio ágar Czapek (CZ), apresentam consistência velutínea, coloração branca, que com o passar dos dias torna-se verde azulada ou azul acinzentada, reverso creme, amarelo, verde escuro ou marrom escuro. Microscopicamente, apresentam cabeças conidiais colunares, vesículas em forma de balão e fiálides unisseriadas, conidióforos de parede lisa e de coloração verde oliva, com conídios medindo, aproximadamente, 2,5-3 µm de diâmetro, globosos a subglobosos de coloração verde oliva e superfície ligeiramente equinulada (BALAJEE; MARR, 2006; PITT; SAMSOM, 2007; SAMSOM et al., 2007a,b,c).

Os conídios de *Aspergillus* spp. são bem adaptados para dispersão pelo ar e possuem características que permitem a permanência no ar por períodos muito longos, como o tamanho pequeno e hidrofobicidade; aumento da resistência no ar, melhorando a disperção, como a ornamentação dos esporos, com paredes equinuladas, observadas em *A. fumigatus;* além da pigmentação, dada pela melanina, que torna essas estruturas viáveis por um período prolongado em condições adversas; esses fatores associados a outras características fazem com que espécies de *Aspergillus* tenham um padrão de distribuição global (O'GORMAN, 2011).

2.2.1.1 Fatores de Virulência

Entre outras espécies causadoras da aspergilose, *A. fumigatus* destaca-se como sendo o principal agente etiológico, responsável por, aproximadamente, 90% dos casos (ALANGADEN, 2011; FERNÁNDEZ et al., 2014; PATTERSON; STREK, 2014).

Neste contexto, diversas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de determinar características que conferem a esse microrganismo a capacidade de causar doença. Tem sido demonstrado que a virulência de *A. fumigatus* é multifatorial. Estudos sugerem que este fungo possui mecanismos como termotolerância, enzimas extracelulares, pigmentos e secreção de metabólitos tóxicos, que proporcionam sua sobrevivência no ambiente por conferirem

vantagens competitivas contra os microrganismos que compartilham o mesmo nicho ecológico (DAGENAIS; KELLER, 2009; LATGÉ, 2003; YOUNGCHIM et al*.,* 2004).

A germinação de conídios de *Aspergilus* a 37 °C correlaciona-se com patogenicidade e *A. fumigatus* é mais termotolerante que outros agentes etiológicos da aspergilose, crescendo bem a 37 °C e suportando temperaturas acima de 50 °C. Especula-se que o crescimento em altas temperaturas pode induzir a expressão de genes de virulência que conferem benefícios adicionais, embora faltem evidências para esta teoria (ARAUJO; RODRIGUES, 2004; DAGENAIS; KELLER, 2009).

A comparação do crescimento de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* demonstrou correlação entre a taxa de germinação e prevalência de patógenos. As taxas de germinação dos conídios dessas espécies foram semelhantes em temperaturas até 30 °C, mas diferiu a 37 °C e 41 °C. Nesta última temperatura, a germinação de conídios de *A. fumigatus* foi aumentada, a germinação de conídios de *A. flavus* diminuiu 45%, e no caso de *A. niger* não houve germinação dos conídios. Estes dados demonstraram que a temperatura ideal para crescimento de *A. flavus* e *A. niger* é de cerca de 30 °C. Sugerindo que a temperatura pode desempenhar um papel crucial na seleção de espécies patogênicas de *Aspergillus* (ARAUJO; RODRIGUES, 2004).

Aspergillus fumigatus dispõe de estratégias que o auxiliam na aquisição de nutrientes, bem como na invasão tecidual. Alguns destes mecanismos são enzimas extracelulares e sideróforos (SHARON; HAGAG; OSHEROV, 2009; SCHRETTL et al*.,* 2010).

A grande variedade de proteases produzidas por *A. fumigatus* inclui metaloproteases, proteases alcalinas, aspartil protease, serina protease e elastases, além da produção de lipases. Em um estudo realizado por Alp e Arikan (2008), utilizando isolados clínicos de *Aspergillus* spp., *A. fumigatus* apresentou atividade não só elastinolítica, mas também de proteases ácidas e fosfolipases, enquanto as cepas de *A. flavus* apresentaram apenas atividade elastinolítica, e *A. niger* apresentou apenas atividade fosfolipásica. Estas enzimas podem atuar tanto na digestão para assimilação de substratos protéicos, como contribuindo para invasão das hifas nos tecidos do hospedeiro, funcionando assim, como fatores de virulência do fungo (DAGENAIS; KELLER, 2009; KRISHNAN; MANAVATHU; CHANDRASEKAR, 2009; OKUMURA et al., 2004;).

Em 2009, os resultados de dois grupos de pesquisa trouxeram para discussão qual o verdadeiro impacto das proteases secretadas durante a invasão tecidual na aspergilose pulmonar; estes informaram sobre clonagem e deleção de um fator de transcrição, *PrtT*, que controla a expressão de múltiplas proteases extracelulares (BERGMANN et al., 2009;

SHARON; HAGAG; OSHEROV, 2009). Surpreendentemente, embora observada diminuição da morte de células epiteliais pulmonares e de eritrócitos, e a ausência de atividade de proteases extracelulares pelo mutante, a virulência das cepas não foi atenuada em camundongos imunossuprimidos. Os autores sugerem que as proteases de *A. fumigatus* sob a regulação deste fator de transcrição não estão relacionadas à patogenicidade, embora o envolvimento de outras enzimas proteolíticas, cuja expressão é regulada durante a infecção pulmonar, não pode ser excluída (SHARON; HAGAG; OSHEROV, 2009).

A capacidade de adquirir ferro do ambiente é comum para a maioria dos organismos patogênicos. O ferro é um co-fator para catalases, oxigenases e peroxidases e, portanto, desempenha um papel importante na resistência contra o estresse oxidativo (HERSLETH et al., 2006). *A. fumigatus* dispõe de sistemas de captação de ferro, os sideróforos, que parecem ser essenciais para a virulência (DAGENAIS; KELLER, 2009; SCHRETTL et al., 2004; 2010). Estes sistemas são quelantes do ferro férrico; e são em número de quatro em *A. fumigatus*, dois intracelulares e dois extracelulares. Mutantes que não possuem qualquer um destes sideróforos, têm a virulência significantemente atenuada, indicando que estas moléculas, tanto intracelulares como extracelulares, são necessárias para a virulência deste fungo (DAGENAIS; KELLER, 2009; SCHRETTL et al., 2010).

A melanina, um pigmento castanho-escuro ou negro formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos, é outro importante fator de virulência de *A. fumigatus*, sendo um dos principais componentes da MEC desta espécie. A sua síntese está associada à virulência de uma série de fungos patogênicos como *Cryptococcus neoformans* (ROSAS et al., 2000a,b; CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000), *Sporothrix schencki*i (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; MORRIS-JONES et al., 2003), *Histoplasma capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2002) e *Paracoccidioides brasiliensis* (TABORDA et al., 2008).

Nos conídios de *A. fumigatus* está presente um pigmento verde-azulado derivado de um composto da via de produção da melanina, o dihidroxinaftaleno (WATANABE et al., 2000); este pigmento é produzido tanto *in vitro* quanto *in vivo* (YOUNGCHIM et al*.,* 2004). Jahn et al. (2000) demonstraram que a perda do pigmento conidial, em *A. fumigatus* e *A. niger*, está relacionada a um aumento da susceptibilidade às espécies reativas do oxigênio (ROS) liberados por leucócitos polimorfonucleares (LPMNs) e monócitos. Além disso, conídios que não possuem esse pigmento se tornam mais susceptíveis ao ataque de monócitos *in vitro*, e apresentam virulência reduzida em modelos animais (YOUNGCHIM et al*.,* 2004).

A melanina encontrada em espécies de *Aspergillus* também protege os conídios de fatores ambientais como calor, radiação ultravioleta (UV) e variações de pH o que demonstra uma vantagem de sobrevivência no organismo humano e nos mais variados ambientes, atuando como um importante fator de virulência, pois afeta a resposta imune ao patógeno, constituindo-se, portanto como fundamental para que ocorra invasão tecidual (BEAUVAIS et al*.,* 2007; CHAI et al., 2010; KRISHNAN; MANAVATHU; CHANDRASEKAR, 2009; LOUSSERT et al*.,* 2010; NAGGIE; PERFECT, 2009; PIHET et al., 2009; SUGUI et al., 2007a; TABORDA et al., 2008).

Aspergillus fumigatus secreta numerosos metabólitos secundários, os quais proporcionam uma blindagem química contra antagonistas ou predadores. Asp-hemolisina é uma toxina hemolítica e citotóxica para neutrófilos e macrófagos. Fumagilina inibe a proliferação de células endoteliais, a angiogênese e se destaca com propriedades amebicidas. Ambas inibem a função de leucócitos em termos da migração, a produção de superóxido e atividade fungicida, porém, o metabólito secundário que desperta o maior interesse em *A. fumigatus* é a gliotoxina, devido às suas potentes propriedades imunossupressoras, citotóxicas e antiangiogênicas e de ser facilmente detectada durante a infecção experimental e no soro de pacientes com aspergilose (ASKEW, 2008; BUGLI et al., 2014; DAGENAIS; KELLER, 2009; FALLON; REEVES; KAVANAGH, 2011; GUINEA et al., 2011; HUMMEL et al., 2009; KAMEI; WATANABE, 2005; KWON-CHUNG; SUGUI, 2013; REMENTERIA et al., 2005).

Vem sendo discutida a produção de MEC por *A. fumigatus,* a qual é gerada tanto no aspergiloma quanto na AI, como um potencial fator de virulência (RAJENDRAN et al*.,* 2011; RAMAGE et al*.,* 2011b). A MEC é composta principalmente por galactomanana, galactosaminogalactano, α-1,3-glucano e melanina. A galactomanana é o constituinte principal da parede celular deste fungo, detendo 14% de sua constituição, podendo ser encontrada na MEC e no interior da célula fúngica (BEAUVAIS et al*.,* 2007; LOUSSERT et al*.,* 2010).

2.2.1.2 Gliotoxina

Toxinas fúngicas são metabólitos secundários, os quais variam de funções, desde imunossupressores a antibióticos. São caracterizados pelo baixo peso molecular e dispensáveis ao crescimento fúngico; entretanto, objetivam a adaptação a ambientes hostis,

como frente a limitação nutricional ou em presença de competidores ambientais (GARVEY; KELLER, 2010; SHERIDAN; DOLAN; DOYLE, 2015).

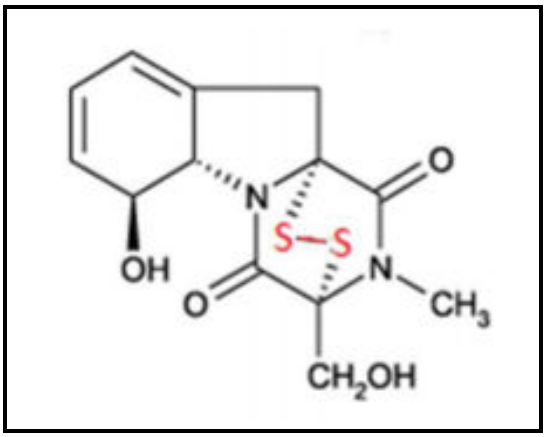
Metabólitos secundários são muitas vezes bioativos, produzidos como famílias de compostos ligados a fases restritas do ciclo de vida dos fungos, com produção geralmente correlacionada a um estágio específico de diferenciação morfológica. Organismos produtores podem crescer sem sintetizar estes metabólitos, e a síntese ter distribuição taxonômica restrita a apenas um pequeno grupo de indivíduos (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; WIEMANN et al., 2013).

Aspergillus spp. secretam uma grande variedade de metabólitos secundários como policetídeos, representados pelos peptídeos cíclicos, alcalóides e sesquiterpenóides; além de epipolitiodioxopiperazinas (ETPs), as quais são caracterizadas pela presença de uma ponte dissulfeto no interior de um anel de dicetopiperazina. Este anel é derivado de um dipeptídeo cíclico e sua ponte dissulfelto lhe confere toda a toxicidade conhecida destas moléculas, alvo de muitas investigações sobre a sua estrutura e atividade (CERQUEIRA et al., 2014; FRISVAD et al., 2009; GARDINER; WARING; HOWLETT, 2005).

A mais bem caracterizada ETP é a gliotoxina (GT) (326 Da) (Figura 2), produzida durante o crescimento de hifas. Poucos dados estão disponíveis sobre a sua produção entre os diferentes gêneros dos fungos. Sabe-se que a GT pode ser produzida por isolados de *A. fumigatus*, *Eurotium chevalieri*, *Gliocladium fimbriatum*, e um número limitado de outras espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, mas nem todos os isolados de uma mesma espécie podem produzir GT (GARDINER; WARING; HOWLETT, 2005). Há relatos de que *A. fumigatus* e *A. terreus* são produtores desta toxina, enquanto que *A. nidulans* não a produz (FOX; HOWLETT, 2008; PATRON et al., 2007).

Acredita-se que a toxicidade da GT é mediada pela ponte dissulfeto no interior do anel de dicetopiperazina por duas vias principais: (i) inativação de proteínas pela formação de ligação cruzada com peptídeos que contêm resíduos de cisteína, e (ii) pela geração de ROS por meio do ciclo redox (GARDINER; WARING; HOWLETT, 2005; RODRIGUEZ; CARRASCO, 1992). A formação da ponte dissulfeto pode ser reprimida pela adição de redutores celulares como a glutationa e o ditiotreitol, os quais inibem a produção de espécies redox e impedem a formação da ponte (GARDINER; WARING; HOWLETT, 2005).

Figura 2 – Estrutura química da gliotoxina.



Fonte: Miralles, 2015

A produção de GT em culturas de *A. fumigatus* foi observada primeiro por Menzel, Wintersteiner e Hoogerheide em 1944, como um contaminante na preparação de experimento para produção de outro metabólito secundário, a fumigacina.

Aspergillus fumigatus é o principal produtor de GT entre as espécies de *Aspergillus,* sendo estabelecida como um dos fatores de virulência deste fungo (MIRALLES, 2015; SUGUI et al*.,* 2007b).

Similar a outros organismos produtores de GT, todos os genes envolvidos na biossíntese da GT estão organizados em um *cluster* no genoma do *A. fumigatus* (PATRON et al*.,* 2007). Este cluster, conhecido como *gli cluster*, compreende 13 genes (GARDINER; HOWLETT 2005; SCHRETTL et al., 2010) e requer uma oxidoredutase (GliT) para proteger este organismo de GT exógena (SCHRETTL et al., 2010).

O primeiro passo para a biossíntese da GT é catalisado por uma peptídeo-sintase não-ribossomal codificada pelo gene *gliP*, cuja deleção resulta na interrupção da síntese de GT em cepas de *A. fumigatus*, com consequente redução dos efeitos *in vitro* (SUGUI et al., 2007b).

Isolados fúngicos nos quais o gene *gliP* foi deletado (Δ*gliP*) falharam em produzir GT. Dois trabalhos não relataram diferença na sobrevivência das cobaias após a infecção com cepas Δ*gliP*, em cobaias neutropênicas (CRAMER et al., 2006; KUPFAHL; GEGINAT; HOF, 2006). Contudo, um terceiro grupo de pesquisa (SUGUI et al., 2007b) demonstrou a redução da virulência de cepas Δ*gliP* em um modelo de aspergilose pulmonar com baixo inóculo, em cobaias tratadas com corticosteróides. Estes dados sugerem que a GT pode ser dispensável para a virulência de *A. fumigatus* em alguns hospedeiros, mas em outros não, e não exclui um papel de virulência das inúmeras outras toxinas produzidas por este organismo.

Entre as várias espécies do gênero *Aspergillus*, apenas a produção de GT por *A. fumigatus* foi estudada mais profundamente. A freqüência média da produção em cepas

ambientais de *A. fumigatus* varia entre 0% e 33%, podendo chegar a 96%, e entre cepas clínicas de 93% a 98% (EL-SHANAWANY; MOSTAFA; BARAKAT, 2005; KUPFAHL et al., 2008; SCHARF et al., 2012). Para *A. flavus* e para *A. niger* provenientes de diversos espécimes clínicos, a produção de GT varia de 4% a 13% e 56% a 75%, respectivamente (KUPFAHL et al., 2008; LEWIS et al., 2005a,b).

Kupfahl et al. (2008) avaliaram a produção de GT, em isolados a partir de fonte ambiental e de espécimes clínicos, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)/ *High performance liquid chromatography* (HPLC) e espectrofotometria de massa, após 5 dias de cultivo. Quase todos os isolados de *A. fumigatus* de origem clínica (98%, n = 53) e do ambiente (96%, n = 47) produziram GT. Entre as outras espécies de *Aspergillus* testadas, uma porcentagem significativamente menor foi capaz de produzir a toxina: *A. terreus* (n = 27), *A. niger* (n = 16), e *A. flavus* (n=15), com frequência de 37%, 56%, e 13%, respectivamente.

Santos, Dorner e Carreira (2003) relataram que apenas 11% das cepas de *A. fumigatus* isoladas de silos na ilha Terceira, nos Açores produziram GT. Em contrapartida, Lewis et al. (2005a), constataram que 93% das cepas de *A. fumigatus* (n = 40) isoladas entre 1998 e 2003 a partir de amostras respiratórias e tecidos de pacientes com câncer no Anderson Cancer Center, em Houston, Texas (EUA) foram produtores de GT em comparação com 75% de cepas de *A. niger* (n = 9), 25% de *A. terreus* (n = 27) e 4% dos isolados de *A. flavus* (n = 18). Além disso, as concentrações de GT produzida pelos isolados de *A. fumigatus* foram significativamente maiores que as de outras espécies.

As discrepâncias entre os resultados está no fato de que a GT atua, provavelmente, como um fator de virulência *in vivo* e, assim, é necessária para estabelecer a infecção por *A. fumigatus*. Esta hipótese é apoiada pela observação de que a GT retarda significativamente o movimento ciliar, causa danos ao epitélio ciliado respiratório humano, além de possuir inúmeras propriedades imunossupressoras (HOHL; FELDMESSER, 2007; KUPFAHL et al., 2008; SCHLAM et al*.,* 2016).

In vitro, a GT regula um largo espectro de efeitos supressivos sobre diferentes tipos de células do sistema imunológico, como inibição da função de LPMNs, macrófagos e células T citotóxicas, pela indução da apoptose, bloqueio da produção de citocinas, da apresentação do antígeno, além de atividade ciliostática sobre as células epiteliais do aparelho respiratório (CERQUEIRA et al., 2014; HOHL; FELDMESSER, 2007; KUPFAHL; GEGINAT; HOF, 2006; KWON-CHUNG; SUGUI, 2009, 2013; NISHIDA et al., 2005; SCHARF et al., 2012; SCHLAM et al*.,* 2016; SPETH et al., 2011).

Os efeitos supressivos são resultado de diferentes mecanismos, sendo o mais importante, provavelmente, a inibição do fator de transcrição NF-kB, o principal regulador da transcrição do gene de citocinas pró-inflamatórias. Uma vez que este fator é uma parte integrante da resposta imunológica e inflamatória e controla a expressão de algumas citocinas, a sua inibição pode contribuir para as propriedades imunossupressoras das ETPs (GARDINER; WARING; HOWLETT, 2005; LEWIS et al., 2005a).

Em cobaias imunocompetentes, a administração de GT resulta em um nível de imunossupressão suficiente para tornar os animais suscetíveis à AI após exposição aos conídios de *A. fumigatus* (LEWIS et al., 2005a). Desde que foi possível a detecção da GT em tecidos pulmonares de cobaias com AI induzida experimentalmente (KUPFAHL; GEGINAT; HOF, 2006; LEWIS et al., 2005a), estes achados sugerem que a função da GT seria auxiliar na evasão do fungo de células efetoras do sistema imunológico do hospedeiro (CHOTIRMALL et al., 2014).

Em concentações nanomolares, a GT interfere na produção e liberação de oxidases dependentes de NADPH e dos LPMNs (TSUNAWAKI et al., 2004) e altera a função de fagocitose dos macrófagos (SCHRETTL et al., 2010). Em concentrações micromolares, a GT induz apoptose de macrófagos e LPMNs, células dendríticas, hepatócitos, fibroblastos e células de câncer (COMERA et al., 2007; KHOUFACHE et al., 2007; KWEON et al., 2003; PAN; HARDAY, 2007; STANZANI et al., 2005). Além disso, esta toxina pode ser detectada *in vivo* em hospedeiros infectados por *A. fumigatus* (BOK et al., 2005; LEWIS et al., 2005a).

Há relatos de inibição da angiogênese durante o desenvolvimento da aspergilose invasiva, pela GT. Em hospedeiros suscetíveis, angioinvasão por *A. fumigatus* causa trombose, hipóxia e liberação de citocinas pró-inflamatórias, os quais são estímulos para a angiogênese. Contudo, proliferação fúngica e extensa necrose coagulativa são particularmente proeminentes neste quadro clínico (BEN-AMI et al., 2009; KONTOYIANNIS, 2010).

Ben-Ami et al. (2009) demonstraram a supressão da angiogênese por *A. fumigatus in vitro* e em modelo animal neutropênico de aspergilose cutânea. A supressão do gene *LaeA*, regulador global do metabolismo secundário, aboliu a atividade antiangiogênica de *A. fumigatus*, indicando que este processo é mediado por meio da produção de metabólitos secundários, particularmente, a GT.

Ainda não está esclarecido em qual etapa da infecção a GT atua *in vivo*; entretanto, estudos indicam que esta toxina atua quando alguma função dos neutrófilos está presente, levantando a possibilidade de que os neutrófilos são os principais alvos desta toxina

(ASKEW, 2008; KUPFAHL et al., 2008). Segundo Lewis et al. (2005a,b), novos estudos são necessários para melhor definição do papel da GT na patogênese da aspergilose invasiva.

Bruns et al. (2010b) demonstraram que durante a formação do biofilme de *A. fumigatus*, alguns dos genes envolvidos na biossíntese de GT tiveram expressão aumentada em até 12 vezes quando comparados aos de células planctônicas. Enquanto que abordagens imunológicas e CLAE foram capazes de detectar quantidade aumentada de GT no biofilme de *A. fumigatus* (BUGLI et al*.,* 2014).

Os estímulos externos que induzem a produção de GT permanecem desconhecidos, mas a transcrição dos genes é afetada por vários fatores, como pH, temperatura, composição e aeração do meio de cultura, ou por fatores desconhecidos durante a infecção de cobaias ou durante o confronto de *A. fumigatus* com granulócitos neutrofílicos (MCDONAGH et al., 2008; SUGUI et al*.,* 2008). Notavelmente, a própria GT induz, até certo ponto, a transcrição de genes envolvidos em sua biossíntese (CRAMER et al., 2006).

2.3 BIOFILME DE *Aspergillus fumigatus*

Biofilmes são comunidades altamente estruturadas, nas quais os microrganismos se encontram associados a uma superfície e ligados uns aos outros, e toda esta comunidade está envolvida em um material extracelular protetor, denominado de matriz extracelular (MEC) (RAMAGE et al*.,* 2009).

As primeiras ideias a respeito de biofilmes vieram da percepção de que a maioria dos microrganismos está em seus *habitats* naturais ligados a uma superfície dentro de um ecossistema multicelular estruturado e não como organismos flutuantes livres, denominados planctônicos (DONLAN, 2002; MOWAT et al*.,* 2008a).

Em 1940 surgiram os primeiros relatos de biofilmes a partir de estudos realizados com bactérias, quando foi observado pela primeira vez, por Heukelekian e Heller, o "efeito garrafa" em microrganismos marinhos, demonstrando que o crescimento de bactérias era consideravelmente aumentado quando estas estavam ligadas a uma superfície (PERCIVAL et al*.,* 2011). Entretanto, a primeira análise de biofilmes não foi reconhecida até 1978, quando Costerton e colaboradores demonstraram que muitas bactérias passavam a maior parte de sua existência em comunidades sésseis ligadas à superfície. A partir de então, inúmeros trabalhos foram realizados com a finalidade de esclarecer aspectos a respeito do desenvolvimento destas comunidades, particularmente tendo destaque os trabalhos com bactérias e leveduras,

principalmente com *Candida albicans* (LOUSSERT et al., 2010; MOWAT et al., 2008b; RAMAGE et al., 2001; SHOPOVA et al., 2013). Apenas em 2007, Beauvais e colaboradores desenvolveram um estudo sobre a capacidade de produção de biofilme por *Aspergillus fumigatus*.

Um número cada vez maior de estudos tem demonstrado que tanto o comportamento quanto a fisiologia de células isoladas e em populações multicelulares são diferentes, isso tem sido extensivamente provado, principalmente, por pesquisas realizadas com biofilmes bacterianos e de leveduras (BEAUVAIS et al., 2007; RAMAGE et al., 2009).

Crescer em comunidades multicelulares confere aos fungos a aquisição de certas vantagens, as quais incluem a ajuda na colonização do substrato; proteção contra agressões do ambiente, resistência ao estresse físico e químico, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica (BEAUVAIS et al., 2007).

Tem sido demonstrado que nas formas de infecção causadas por *A. fumigatus*, este se apresenta como um emaranhado de hifas formando uma rede (SHIBUYA et al., 2004), característica que, morfologicamente, lembra o biofilme de outros fungos como de *C. albicans* (RAMAGE et al., 2001).

A forma de aspergiloma, também conhecida com "bola fúngica", ocorre em cavidades pré-existentes no pulmão e em seios paranasais cronicamente obstruídos; e está em contato direto com o ar, consistindo em uma massa esferoidal de hifas, no interior da qual as hifas encontram-se aglutinadas formando uma macrocolônia de elementos fortemente associados; esta forma da doença pode evoluir para a forma invasiva, que assim como o aspergiloma, inicia-se como uma microcolônia aeróbica nos alvéolos pulmonares (BEAUVAIS et al., 2007). Além das evidências histológicas a resistência aos antifúngicos por estas doenças é um forte indicativo de que a AI e o aspergiloma constituem-se como biofilmes *in vivo* (SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008).

Até o estudo realizado por Beauvais et al. (2007), no qual isolados de *A. fumgitatus* foram testados para a formação de biofilme em condições de crescimento aéreo e estático, mimetizando o crescimento *in vivo*, todas as pesquisas realizadas com este fungo haviam sido realizadas em condições de submersão e sob agitação. Assim, este estudo foi o primeiro a demonstrar, para este organismo, as diferenças de crescimento entre células isoladas e crescidas em comunidades multicelulares, bem como a existência de uma MEC circundando toda a comunidade.

Subsequentemente, em 2008, Seidler, Salvenmoser e Müller demonstraram a capacidade do *A. fumigatus* formar biofilme *in vitro* em coculturas com células de epitélio

bronquial humano e células epiteliais bronquiais de paciente com fibrose cística, constituindo este um forte indício da capacidade deste fungo de crescer em comunidades multicelulares *in vivo*.

2.3.1 Etapas de formação e características do biofilme

2.3.1.1 Adesão

O estabelecimento inicial das infecções crônicas por fungos filamentosos, não dimórficos, envolve a germinação dos conídios, crescimento das hifas e, posteriormente, invasão dos tecidos pulmonares (FILLER; SHEPPARD, 2006; RAMAGE et al., 2011a). A primeira etapa para o estabelecimento da colonização de um substrato pelo fungo é a adesão, a qual se dá por meio de diversas interações estabelecidas entre os conídios e a superfície do substrato (RAMAGE et al., 2011a).

Tais interações são complexas e incluem processos físicos e biológicos. Propriedades que subsidiam este processo têm sido indicadas como a hidrofobicidade, carga eletrostática e rugosidade da superfície, constituindo-se como características importantes para o passo inicial da aderência de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (BEAUVAIS et al., 2007; BIGERELLE et al., 2002; DUFRENE, 2000).

Apesar da importância do processo de adesão, pouco é conhecido a seu respeito (SHEPPARD, 2011). Diversos estudos têm se focado principalmente na parede celular fúngica, dando ênfase às proteínas, em especial às hidrofobinas, as quais são responsáveis pela alta hidrofobicidade dos conídios. Estas proteínas estabilizam a adesão dos esporos às superfícies hidrofóbicas tanto naturais como artificiais, possivelmente gerando sinais morfogênicos (LINDER et al., 2005; RAMAGE et al., 2011a; SCHOLTMEIJER et al., 2001; WÖSTEN, 2001). Entretanto das seis hidrofobinas de *A. fumigatus,* apenas a RodAp e RodBp foram estudadas quanto a estas características, permanecendo o papel na adesão das demais hidrofobinas desconhecido (RAMAGE et al., 2011a; SHEPPARD, 2011).

Outros estudos sobre aderência fúngica focaram na ligação entre os constituintes da parede celular e componentes da membrana basal, como fibronectina e laminina (GIL et al.,1996; PENALVER et al.,1996; TRONCHIN et al., 1997). Os conídios de *A. fumigatus* exibem ligação específica a estas moléculas, a qual pode ser inibida quando os conídios são tratados com tripsina, sugerindo que uma proteína media esta ligação (GIL et al.,1996; PENALVER et al.,1996). Em estudo subsequente, foi descoberto o alérgeno AspF2, um

polipeptídeo de 37 KDa, como sendo uma das proteínas que ancora o fungo à laminina (BANERJEE et al., 1998).

Tendo como base estudos realizados com *C. albicans*, na qual proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) tem sido demonstradas como tendo um papel chave na adesão deste fungo às superfícies (SHEPPARD et al., 2004b; SHEPPARD, 2011), Levdansky et al. (2007), fizeram um estudo para identificar estas proteínas também em *A. fumigatus*, e das 292 proteínas identificadas, apenas 10 possuíam relação com as GPI de *C. albicans.* A deleção de um desses genes *cspA* (Afu3g08990) estava associado com a redução na aderência dos conídios à matriz de células pulmonares, mas não à laminina ou ao poliestireno.

A partir destes estudos, a maioria dos trabalhos que foram realizados até recentemente, vêm utilizando a bioinformática como ferramenta para descobrir possíveis adesinas, entretanto testes de adesão *in vitro* ou deleção dos prováveis genes para estabelecimento do papel biológico destas proteínas não tem sido desenvolvidos (CHAUDHURI et al., 2011; RAMANA; GUPTA, 2010; SHEPPARD, 2011; UPADHYAY et al., 2009).

Além das proteínas, diversos grupos vêm estudando o papel dos carboidratos na adesão fúngica, tendo em vista a grande variedade destes na parede celular, os quais incluem α e β-glucanos, quitina, galactomanana e galctosaminogalactano (SHEPPARD, 2011). Apesar dos trabalhos realizados, ainda não foi possível à correlação entre a presença e quantidade destes açúcares na parede celular de *A. fumigatus* e a virulência deste fungo (LAMARRE et al., 2009; PAUL et al., 2011; SCHMALHORST et al., 2008). Esses estudos sugerem que galactofuranose e galactomanana não funcionam como adesinas, mas podem modular a expressão e exposição de outras moléculas que mediam a adesão (SHEPPARD, 2011).

Além dos fatores citados, uma crescente importância vem sendo dada a MEC na adesão celular. Este aglomerado de substâncias, no qual se incluem proteínas, carboidratos e pigmentos, tem sido mostrado como uma espécie de "cola", que ajuda a manter as hifas juntas e presas às superfícies (LOUSSERT et al., 2010; MOWAT et al., 2007; RAMAGE et al., 2011a; SHEPPARD, 2011).

2.3.1.2 Desenvolvimento

Um fator de grande importância para a integridade estrutural do biofilme de *A. fumigatus* é a densidade do inóculo dos conídios. Mowat et al. (2007) demonstraram, utilizando microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica, que a estrutura, morfologia e integridade do biofilme é dependente desta concentração. Uma concentração baixa do

inóculo, $1x10^4$ conídios/mL, produz um biofilme espesso e que facilmente rompe-se, enquanto que um inóculo com alta densidade, $1x10^6$ conídios/mL, dá origem a biofilmes relativamente mais finos e com pouca biomassa; sendo a concentração ideal em torno de $1x10^5$ conídios/mL (KAUR; SINGH, 2014; MOWAT et al., 2007). Entretanto alguns trabalhos, quando estudam o desenvolvimento do biofilme, utilizam a concentração de $1x10^6$ conídios/mL, porém vale salientar que essa diferença na concentração é devido a particularidades do modelo utilizado, cocultura com células epiteliais pulmonares, além de meio de cultura diferente (GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2016; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008; VILLENA; GUTIERREZ-CORREA, 2007).

Como os biofilmes de outros microrganismos, o biofilme de *A. fumigatus* possui fases bem diferenciadas e sucessivas de desenvolvimento (CHANDRA et al., 2001; KAUR; SINGH, 2014; RAMAGE et al., 2011a; SINGHAL et al., 2011). Estas etapas ocorrem tanto *in vitro* em superfície de poliestireno como em modelos de cocultura com células de epitélio bronquial humano (SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008); e obedecem a seguinte sequência: aderência dos conídios às células epiteliais, proliferação das hifas, produção de MEC, entrelaçamento das hifas e envolvimento das mesmas pela MEC e, finalmente, a formação de canais. Assim, os biofilmes maduros mostram uma camada basal de esporos, uma intermediária de hifas e todo este conjunto recoberto por uma MEC (GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2016; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008; SINGHAL et al., 2011).

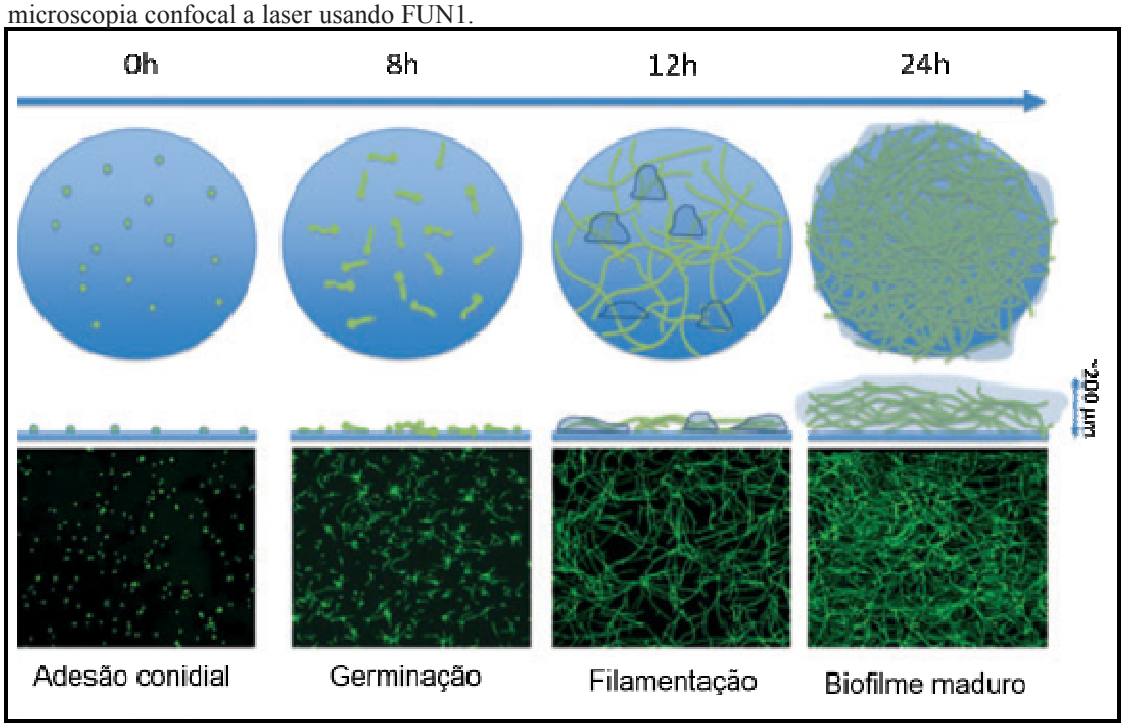
Quando utilizadas técnicas de microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica é possível avaliar as características do desenvolvimento. Após o contato inicial dos conídios com a superfície, há uma fase *lag* (fase de latência), na qual ocorre a adesão destes conídios (4-8 horas). Em seguida, ocorre tumefação e germinação dos conídios que vai de seis a oito horas. Filamentação e entrelaçamento das hifas formando uma monocamada, fase que se inicia de 10 a 16 horas, seguida por um aumento na complexidade estrutural e arquitetura tridimensional ao longo das subsequentes quatro a oito horas com produção de exopolissacarídeos; subsequentemente, atingi-se um *platô* cessando o desenvolvimento do biofilme e um estado constante ocorre, em torno das 24 horas, findando com a maturação do biofilme (Figura 3). Durante este período a espessura do biofilme aumenta de 10 para 200 μm (KAUR; SINGH, 2014; MOWAT et al., 2007) e a adesão entre hifas e anastomose também são observadas (GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2016). Esta cinética de crescimento do biofilme de *A. fumigatus* possui padrão semelhante à cinética de desenvolvimento do biofilme

de *C. albicans* e *A. niger* (RAMAGE et al., 2001; VILLENA; GUTIERREZ-CORREA, 2007).

Além disso, as hifas no biofilme formam estruturas bem definidas, nas quais estão aglomeradas em feixes dispostos paralelamente em uma direção, o que garante a sustentação da comunidade, enquanto que outros feixes se cruzam e dão estabilidade à estrutura (SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008).

O conhecimento e entendimento das fases de crescimento e desenvolvimento do biofilme são de extrema importância e refletem-se nos resultados da terapia antifúngica, nos quais a resistência está intimamente associada às bombas de efluxo e produção de uma MEC espessa (RAJENDRAN et al., 2011).

Figura 3 – Representação esquemática do desenvolvimento de biofilme de *Aspergillus fumigatus*, iniciando pela adesão dos conídios, germinação (8h), monocamada de hifas entrelaçadas (12h) e biofilme maduro envolto por uma matriz extracelular (24h), acompanhados por micrografias obtidas de microscopia confocal a laser usando FUN1.



Fonte: Adaptado de Ramage *et al.,* 2011a.

Poucos estudos têm sido realizados para elucidação dos mecanismos moleculares da formação e manutenção do biofilme de *A. fumigatus.* Burns et al. (2010b), utilizando as técnicas de *real time* PCR, *Microarray,* eletroforese bidimensional e MALDI-TOF MS iniciaram os trabalhos para a compreensão dos mecanismos moleculares que estão envolvidos durante o desenvolvimento do biofilme; assim, compararam a expressão de genes na condição

de biofilme e em células planctônicas. Foi demonstrado que no período de 24 horas 740 genes foram regulados diferencialmente, sendo que 179 apresentaram altas taxas de expressão, enquanto que 561 foram pouco expressos; entretanto, com 48 horas de biofilme um total de 687 genes foram expressos diferentemente, dos quais 569 foram bastante expressos enquanto que 118 foram pouco expressos, o que totalizou 143 genes diferentemente expressos em ambos períodos de tempo.

Gibbons et al. (2011) utilizando a técnica de RNA-*sequencing* encontrou dez vezes mais genes expressos que na técnica de *microarray*, perfazendo um total de 3.729 genes diferentemente expressos, destes 2.564 foram *upregulated* e 1.164 *down regulated* no biofilme.

A maioria dos genes, que mostraram altas taxas de expressão, está envolvida na síntese de proteínas, metabolismo, conservação de energia, enquanto que os genes reprimidos estavam envolvidos na transdução de sinais, diferenciação celular, interação com ambiente, biogênese de componentes celulares, regulação do metabolismo entre outros (BURNS et al*.,* 2010b; MUSZKIETA et al*.,* 2013).

Quando comparado o biofilme às células planctônicas, aquele cresce com uma notável reprogramação genética, pois genes que estão envolvidos na sinalização celular e biossíntese de proteínas e aminoácidos são reprimidos, ao passo que genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários aumentaram consideravelmente sua expressão (BURNS et al*.,* 2010b).

Diversos genes envolvidos na codificação de fatores de virulência ou que estão envolvidos indiretamente com o estabelecimento das diversas formas clínicas de aspergilose são largamente expressos quando *A. fumigatus* está formando biofilme (BRUNS et al*.,* 2010b; GIBBONS et al*.,* 2011; MUSZKIETA et al*.,* 2013).

Quase 50% dos fatores de transcrição de *A. fumigatus*, incluindo aqueles que atuam no desenvolvimento sexual e assexual do fungo, são mais expressos quando na condição de biofilme que em células planctônicas (FANNING; MITCHELL, 2012). Adicionalmente, genes envolvidos na expressão de componentes da parede celular também são expressos (BRUNS et al*.,* 2010b; GIBBONS et al*.,* 2011).

Genes que codificam álcool desidrogenases também são expressos, o que pode indicar um possível mecanismo de *quorum-sesing* como para *C. albicans* (NOBILE et al*.,* 2009), entretanto, até agora nada é conhecido sobre esse processo em *A. fumigatus* (BRUNS et al*.,* 2010b).

Os principais alérgenos de *A. fumigatus*, AspF1, AspF2, AspF4 e AspF13 tiveram alta expressão a depender do período de tempo; AspF1 e AspF2 em 24 horas, enquanto que AspF4 e AspF13 em 48 horas. Assim, é possível identificar que os alérgenos são secretados juntamente com a MEC (BRUNS et al*.,* 2010b), com destaque para o alérgeno AspF1, o qual é expresso 30 vezes mais no biofilme (GIBBONS et al*.,* 2011).

Além disso, diversos genes que conferem resistência aos mecanismos de proteção do hospedeiro, bem como genes envolvidos na resistência aos antifúngicos também são mais expressos no biofilme do que em células planctônicas (BRUNS et al*.,* 2010b; GIBBONS et al*.,* 2011; MUSZKIETA et al*.,* 2013).

Genes que codificam as superóxido dismutases para cobre e zinco são bastante expressos durante a condição de biofilme. Estas enzimas inativam os ânions de surperóxido, os principais precursores das ROS, podendo assim conferir resistência as ROS para o biofilme de *A. fumigatus* durante o crescimento e persistência no hospedeiro (BRUNS et al*.,* 2010b; GIBBONS et al*.,* 2011).

Os transportadores de cassete de ligação do ATP (adenosina trifosfato/ transportadores ABC) também são bastante expressos, e seis destes genes são expressos exclusivamente no biofilme. Estes genes são conhecidos por influenciar o desenvolvimento de resistência às drogas; o que indica que enquanto a matriz está sendo produzida pode ocorrer o surgimento da resistência aos antifúngicos (GIBBONS et al*.,* 2011).

Genes envolvidos na produção de metabólitos secundários foram bastante expressos, com destaque para a GT, que é um fator de virulência do fungo por suprimir as respostas imunológicas inata e adaptativa do hospedeiro (BRUNS et al*.,* 2010b; HOF; KUPFAHL, 2009).

Além dos genes que codificam esta micotoxina, outros genes relacionados à metabólitos secundários envolvidos na virulência do *A. fumigatus* também são expressos, como é o caso da fumitremorgina, uma micotoxina capaz de inibir o ciclo celular de mamíferos, a pseurotina A, um composto neurogênico e inibidor de quitinase (GIBBONS et al., 2011; MAIYA et al*.,* 2006). Ainda, somados a estes, genes que codificam tricotecenos, compostos que podem inibir a síntese proteica em organismos eucarióticos (BENNETT; KLICH, 2003; GIBBONS et al., 2011).

Apesar da utilização de tecnologias bastante avançadas e atraentes para análise de grande quantidade de dados ao mesmo tempo, os dados obtidos até o momento ainda não foram capazes de identificar os fatores que compõe a virulência do *A. fumigatus*, sendo

necessários trabalhos focados em vias específicas com utilização de modelos *in vivo* (MUSZKIETA et al., 2013).

2.3.1.3 Resistência aos antimicrobianos

Uma das características que definem o biofilme consiste no marcante aumento da resistência aos antimicrobianos, no entanto os mecanismos envolvidos nesta resistência ainda não foram completamente elucidados (MUSZKIETA et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2011).

A resistência aos antifúngicos é complexa e multifatorial. Pode advir da indução pela exposição a um composto ou por modificações genéticas, estas por sua vez incluem modificações na expressão de moléculas-alvo e expulsão ativa das moléculas do fármaco de dentro da célula através de bombas de efluxo, além de características como a baixa difusão e densidade celular. Assim, enquanto que células livres dependem quase que exclusivamente de modificações genéticas, os microrganismos encontrados nos biofilmes dispõem de grande parte destes mecanismos, se não de todos, para tornarem-se mais resistentes (RAJENDRAN et al., 2011; RAJENDRAN, 2013; RAMAGE et al., 2011b).

Beauvais et al. (2007) ao comparar a atividade de antifúngicos sobre o biofilme e células sésseis de *A. fumigatus*, observaram sensibilidade similar frente ao imidazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina nas duas condições, entretanto a sensibilidade aos polienos, como anfotericina B e nistatina foi dependente da condição de cultura. Após 24 horas de incubação com 200 µg/mL de anfotericina B, o micélio na condição de biofilme foi reduzido em apenas 46%, enquanto que sob agitação, o micélio foi reduzido em 66%. Ainda, houve diferença mais pronunciada quando testada a nistatina, que na concentração de 50 µg/mL inibiu totalmente o crescimento do micélio sob agitação, enquanto que mesmo aumentando a concentração para 200 µg/mL desta droga, o micélio em biofilme podia crescer. Para testar a resistência do biofilme, este foi incubado com α-1,3-glucanase, entretanto, não houve alteração na sua resistência aos polienos.

No trabalho realizado por Mowat et al. (2007), *A. fumigatus* testado na condição de biofilme apresentou resistência 100 vezes maior ao itraconazol e caspofungina quando comparado às células planctônicas.

Em 2008, foi demonstrado que o estado morfológico do biofilme desenvolve um papel crucial na resposta aos antifúngicos. Mowat et al. (2008a) compararam a ação de três antifúngicos, voriconazol, anfotericina B e caspofungina, em diferentes tempos de desenvolvimento do biofilme e demonstraram que: nas primeiras 8 horas, a anfotericina B e

voriconazol foram os antifúngicos mais eficazes; após 12 horas, fase de monocamada de hifas entrelaçadas, a eficácia de todos os antifúngicos foi diminuída excetuando-se anfotericina B, que sobressaiu entre os demais, tanto após 12 quanto após 24 horas, quando as hifas formam uma massa densa. Ainda no mesmo estudo, a anfotericina B se mostrou mais rápida e efetiva contra todas as populações celulares, enquanto que o voriconazol, apesar de muito efetivo contra conídios em germinação, teve sua ação antifúngica diminuida quando a fase de hifas se instalou. Diferentemente dos demais, a caspofungina foi consideravelmente ineficiente contra todas as populações celulares investigadas.

2.3.1.4 Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é característica fundamental para a definição de biofilme, a qual está presente envolvendo o conjunto de hifas, mantendo-as juntas e fixas à superfície, além disso, fornece proteção contra agressões externas, como a ação das células do sistema imunológico do hospedeiro bem como dos agentes antifúngicos (LOUSSERT et al., 2010; MÜLLER; SEIDLER; BEAUVAIS, 2011; RAJENDRAN, 2013; RAMAGE et al., 2009).

Diversos estudos relatam a formação de MEC nos biofilmes de várias espécies fúngicas como *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis* spp., *Blastoschizomyces capitatus*, *Malassezia pachydermatis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oryzae*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus* e *Apophysomyces elegans* (BEAUVAIS et al., 2007; BEAUVAIS et al., 2009; CANNIZZO et al., 2007; CUSHION; COLLINS; LINKE, 2009; D'ANTONIO et al., 2004; MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; SILVA et al., 2009; 2012; SINGH; SHIVAPRAKASH; CHAKRABARTI, 2011; VILLENA; GUTIERREZ-CORREA, 2007).

Em *A. fumigatus* os estudos da MEC se iniciaram com o trabalho de Beauvais et al. (2007) a partir da observação da presença de material extracelular que circundava e mantinha o conjunto de hifas unido quando em condições de crescimento aéreo, biofilme, e não estava presente no micélio crescido sob agitação.

O desenvolvimento da MEC é quase imperceptível até às 16 horas de crescimento do biofilme; contudo, após 20 horas, está presente em toda a superfície da cultura e vai aumentando de espessura conforme a idade da colônia vai avançando (BEAUVAIS et al., 2007). Em cocultura de células do epitélio bronquial, a MEC é formada após 24 horas de incubação (SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008).

Esta matriz é densa tanto cobrindo a colônia quanto dentro da mesma, fazendo com que as hifas permaneçam unidas numa rede organizada, formando canais, pelos quais é provável que passem água e nutrientes para a manutenção de todas as células da colônia fúngica (BEAUVAIS et al., 2007; SINGHAL et al*.,* 2011).

A MEC também está presente *in vivo*, ao redor da massa fúngica que forma o aspergiloma, funcionando como uma cola, a qual aglutina e liga coesivamente as hifas; além de estar presente durante a AI, desempenhando a mesma função que no aspergiloma; entretanto, menos eletrodensa e mais fina, medindo 1,2 μm enquanto que no aspergiloma chega a 4 μm (LOUSSERT et al*.,* 2010).

Nas espécies fúngicas a composição da MEC varia com as espécies, diferentemente da MEC formana no biofilme de *A. fumigatus*, a MEC de *C. albicans* é rica em β-1,3-glucano, enquanto que a de *S. cerevisiae* é rica em α-1,2-1,6-manana, durante a floculação (BEAUVAIS et al., 2009; NETT et al., 2007).

Quanto à composição, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a MEC de *A. fumigatus* é hidrofóbica e é formada por carboidratos, proteínas e pigmentos (BEAUVAIS et al., 2007; LOUSSERT et al., 2010; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008). *In vitro*, a fração de monossacarídeos e poliois é formada por 74% (± 6%) de glicose, 18% (± 5%) de manitol, 5% (± 2,7%) de glicerol e 3% (± 1,4%) de trealose; a galactomanana (GM), polímero de galactofuranose ligado à manana, e α-1,3-glucano também estão presentes, perfazendo um total de 27% das hexoses presentes na MEC (BEAUVAIS et al., 2007).

As proteínas perfazem um total de 2% da MEC; estas incluem os três principais antígenos secretados pelo *A. fumigatus*, dipeptidilpeptidase V (DppVp), catalase B (CatBp) e ribotoxina (AspF1p), os quais são encontrados no soro de pacientes com aspergiloma (SARFATI et al., 2006); as hidrofobinas também estão presentes na superfície da MEC (BEAUVAIS et al., 2007).

Há presença *in vivo* de dois polissacarídeos principais compondo a MEC tanto no aspergiloma como na AI; o galactosaminogalactano (GAG), que é um polímero de galactopiranose ligado à N-acetilgalactosamina, e a GM. Entretanto, quando comparada a produção *in vitro,* a quantidade de GAG é maior *in vivo*, não estando presente em quantidade significativa na parede celular do *A. fumigatus*, enquanto que a GM está presente tanto na parede da célula como em seu interior (LOUSSERT et al., 2010). Interessantemente, tem sido relatado um papel inibitório da galactofuranose e galactopiranose na adesão celular (LAMARRE et al., 2009; PENG et al., 2001).

Quanto ao α-1,3-glucano, no aspergiloma é encontrado na superfície da parede celular do fungo e na camada interna da MEC, enquanto que na AI este polissacarídeo é encontrado apenas dentro da célula fúngica; estes fatos também podem ser observados *in vitro*, quando as hifas cultivadas em condições estáticas e quando sob agitação, as mesmas se comportam como no aspergiloma e na AI, respectivamente (BEAUVAIS et al., 2007; LOUSSERT et al., 2010).

Utilizando ensaios imunocitoquímicos, Loussert et al. (2010) constataram a ausência dos antígenos DppVp, CatBp e AspF1p na MEC tanto no aspergiloma quanto na AI, no entanto encontram-se abundantes na parede celular e no meio intracelular; em contraste com o modelo *in vitro*, no qual estes antígenos são abundantes na MEC (BEAUVAIS et al., 2007).

A melanina também está presente na MEC *in vitro* e *in vivo* (BEAUVAIS et al., 2007; LOUSSERT et al., 2010). Esta é o principal componente da MEC *in vivo* no aspergiloma, entretanto para AI ainda não foi possível sua detecção devido à quantidade de material. No entanto, para outros fungos como *Paracoccidioides brasiliensis*, a melanina já foi demonstrada *in vivo* (TABORDA et al., 2008; YOUNGCHIM; HAY; HAMILTON, 2005).

Recentemente, foi demonstrado que além dos componentes anteriormente citados pela literatura como constituintes da MEC do biofilme de *A. fumigatus*, o ácido desoxirribonucleico extracelular (eDNA) desempenha um papel fundamental na sua composição e estruturação, promovendo maior adesão dos esporos na superfície, aumento da biomassa, estabilidade e integridade estrutural da MEC (KAUR; SINGH, 2014; RAJENDRAN et al., 2013; SHOPOVA et al., 2013). Além disso, Rajendran et al. (2013) demonstraram que a liberação de eDNA por autólise no biofilme está significativamente associada com os níveis de resistência antifúngica, sugerindo que eDNA desempenha um papel importante na resistência do biofilme a antifúngicos.

Quando o *A. fumigatus* encontra-se formando biofilmes sua resistência aos antifúngicos é elevada, por isso, diversos estudos sugerem que a MEC, funcionando harmoniosamente, compõe um dos fatores de grande importância na resistência fúngica; atuando, principalmente, adsorvendo as drogas antifúngicas e impedindo sua difusão (BEAUVAIS et al., 2007; RAJENDRAN et al., 2013; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008). Desta forma, um bom antifúngico não deve apenas atuar no sítio específico, mas deve ter a capacidade de penetrar eficientemente pela MEC do biofilme (LOUSSERT et al., 2010).

Os mecanismos de formação e o papel chave da MEC, e, individualmente, de seus constituintes na formação, manutenção e resistência do biofilme de *A. fumigatus*, não foram

completamente elucidados o que requer maiores investigações nessa área (KAUR; SINGH, 2014; RAMAGE et al., 2011a).

3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *A. fumigatus*

Independentemente da origem ou tempo de preservação, todos os isolados estudados foram capazes de formar biofilme (Tabela 4), com destaque para os isolados URM 5698, URM 5943, URM 5992, procedentes de amostras ambientais, e URM 6562 e URM 6573, obtidos de amostras clínicas. Estes isolados apresentaram valores superiores em todos os períodos de tempo avaliados, não apresentando diferença entre si (p=0,1447). O isolado URM 3812 apresentou menor capacidade de formação de biofilme, quando levada em consideração a produção média ao longo do tempo.

Como demonstrado na tabela 4, a produção de biofilme entre os isolados, quando avaliada em relação ao tempo, exibiu diferença em 24 horas de desenvolvimento do biofilme, apenas entre os isolados URM 5698, URM 5943, URM 5992, URM 6562 e URM 6573, os quais foram superiores em relação as demais; o período de 48 horas foi o diferencial entre eles, enquanto que em 72 horas não houve diferença entre os isolados (p>0,05).

Tabela 4 – Média da produção de biofilme (absorbância 570 nm) de isolados de amostras ambientais e espécimes clínicos de *Aspergilus fumigatus* em função do tempo de desenvolvimento.

ORIGEM	ISOLADOS	PRODUÇÃO DE BIOFILME (Média ± SD)			
		Período de tempo			Produção média
		24 horas	48 horas	72 horas	
AMBIENTAL	URM 3550	0,930 (± 0,062)^{Aa}	2,640 (± 0,348)^{ACb}	3,348 (± 0,172)^{Ac}	2,306 (± 1,243)^{AB}
	URM 3812	1,175 (± 0,089)^{Aa}	1,216 (± 0,023)^{Fa}	3,453 (± 0,045)^{Ab}	1,948 (± 1,304)^{B}
	URM 3933	1,363 (± 0,044)^{Aa}	1,981 (± 0,079)^{ABFb}	3,592 (± 0,006)^{Ac}	2,312 (± 1,151)^{AB}
	URM 4320	1,011 (± 0,057)^{Aa}	2,085 (± 0,112)^{ABFb}	3,314 (± 0,160)^{Ac}	2,137 (± 1,152)^{AB}
	URM 4956	1,014 (± 0,154)^{Aa}	2,015 (± 0,509)^{ABFb}	3,525 (± 0,040)^{Ac}	2,185 (± 1,264)^{AB}
	URM 5492	1,105 (± 0,041)^{Aa}	1,615 (± 0,083)^{BDFa}	3,585 (± 0,033)^{Ab}	2,101 (± 1,309)^{AB}
	URM 5698	2,619 (± 0,446)^{Ba}	3,638 (± 0,003)^{Eb}	3,649 (± 0,023)^{Ab}	3,302 (± 0,591)^{AB}
	URM 5943	2,616 (± 0,384)^{Ba}	3,659 (± 0,49)^{Eb}	3,609 (± 0,019)^{Ab}	3,295 (± 0,588)^{AB}
	URM 5992	3,618 (± 0,015)^{Ca}	3,619 (± 0,019)^{Ea}	3,622 (± 0,040)^{Aa}	3,62 (± 0,002)^{A}
	URM 6151	1,401 (± 0,055)^{Aa}	1,978 (± 0,184)^{ABFa}	3,592 (± 0,047)^{Aba}	2,324 (± 1,136)^{AB}
CLÍNICA	URM 5049	0,904 (± 0,039)^{Aa}	2,157 (± 0,218)^{ABCb}	3,335 (± 0,135)^{Ac}	2,132 (± 1,216)^{AB}
	URM 6559	1,126 (± 0,035)^{Aa}	2,635 (± 0,382)^{ACb}	3,505 (± 0,052)^{Ac}	2,422 (± 1,204)^{AB}
	URM 6560	1,170 (± 0,057)^{Aa}	1,725 (± 0,115)^{BDFa}	3,533 (± 0,034)^{Ab}	2,143 (± 1,236)^{AB}
	URM 6562	3,342 (± 0,162)^{BCa}	3,587 (± 0,024)^{Ea}	3,589 (± 0,035)^{Aa}	3,506 (± 0,142)^{AB}
	URM 6564	1,323 (± 0,035)^{Aa}	2,105 (± 0,097)^{ABFb}	3,575 (± 0,027)^{Ac}	2,334 (± 1,143)^{AB}
	URM 6570	1,280 (± 0,083)^{Aa}	1,928 (± 0,121)^{ABFb}	2,774 (± 0,347)^{Ac}	1,994 (± 0,75)^{B}
	URM 6571	0,975 (± 0,003)^{Aa}	1,437 (± 0,176)^{BFa}	3,556 (± 0,046)^{Ab}	1,989 (± 1,376)^{B}
	URM 6573	3,606 (± 0,012)^{Ca}	3,608 (± 0,031)^{Ea}	3,677 (± 0,011)^{Aa}	3,630 (± 0,040)^{A}
	URM 6576	0,954 (± 0,155)^{Aa}	2,418 (± 0,482)^{ACDb}	3,537 (± 0,032)^{Ac}	2,303 (± 1,295)^{AB}
	URM 6577	1,308 (± 0,051)^{Aa}	3,015 (± 0,197)^{CEb}	3,577 (± 0,044)^{Ab}	2,633 (± 1,182)^{AB}

SD= *Standard deviation* / Desvio padrão. URM= University Recife Mycology (Micoteca URM). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Poucos estudos têm tentado correlacionar a origem dos isolados de *A. fumigatus* à sua capacidade de formação de biofilme.

No presente estudo houve diferença na produção do biofilme entre isolados, mas não entre os grupos de isolados ambientais e clínicos, visto que isolados de origem ambiental foram tão produtores quanto os de origem clínica. González-Ramírez et al. (2016) estudando a produção de biofilme entre isolados ambientais e clínicos de *A. fumigatus* também não observaram diferenças na formação dessa estrutura.

As divergências aqui constatadas, quanto a capacidade de produção de biofilme, podem estar relacionadas a variabilidade genética intraespecífica. Diversas pesquisas têm comparado características, tentando demonstrar as diferenças genéticas, particularmente para

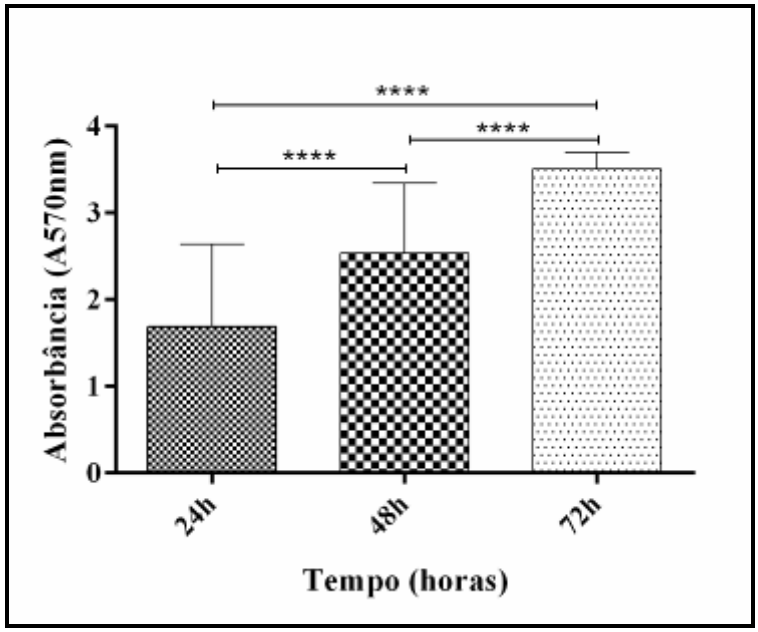
isolados de *A. fumigatus,* entre os obtidos de amostras clínicas e ambientais, encontrando uma grande variedade genética na população deste fungo, não sendo ainda possível a distinção, por alguma característica, para estes dois grupos (ALSHAREEF; ROBSON, 2014; ARAUJO; AMORIM; GUSMÃO, 2010; BALAJEE et al., 2008; DUARTE-ESCALANTE et al*.,* 2009).

Este fato pode ser explicado pela alta taxa de diversidade encontrada para isolados de origem ambiental de *A. fumigatus* (ARAUJO; AMORIM; GUSMÃO, 2010; GUINEA et al., 2011). Além disso, é sugerido que apesar do paciente ser colonizado por vários genótipos de origem ambiental, o ambiente pulmonar parece selecionar os que melhor se adaptam às condições, tornando-se, portanto, patogênicos, levando assim à progressão de uma simples colonização para o estado de doença (DE VALK et al., 2007; GUINEA et al*.,* 2011).

O tempo de preservação não foi fator limitante para a capacidade de formação de biofilme, visto que isolados com 20 anos ou mais de preservação (URM 3812 e URM 3933 – 20 anos; URM 3550 – 23 anos) também produziram biofilme. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram a conservação da viabilidade e de características, incluindo fatores de virulência como a produção de enzimas, de culturas preservadas por métodos adequados, por longos períodos de tempo (BRAZ et al*.,* 2009; GUIMARÃES et al*.,* 2014; LACAZ et al*.,* 2002; NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004).

Comparando-se a evolução da formação e produção desta estrutura ao longo do tempo, todos os isolados apresentaram diferenças na quantidade de biofilme formado, exceto URM 3812, URM 5492, URM 6560 e URM 6571 para os quais os períodos de 24 e 48 horas foram iguais; URM 5698, URM 5943 e URM 6577, para os quais o período de 48 horas foi semelhante ao de 72 horas; e os isolados URM 5992, URM 6151, URM 6562 e URM 6573 para os quais não houve diferença entre os períodos de tempo estudados (Tabela 4). No entanto, quando levada em consideração a produção de biofilme como um todo, foi observado o aumento na quantidade de biofilme proporcional ao tempo de cultivo decorrido (Gráfico 1) concordando com outros trabalhos de análise da cinética do crescimento do biofilme (BEAUVAIS et al*.,* 2007; MOWAT et al*.,* 2007).

Gráfico 1 – Média da produção de biofilme por isolados de *Aspergillus fumigatus* em função do tempo de desenvolvimento.



**** $p \leq 0{,}0001$; h – horas.

Os valores de absorbância são proporcionais à quantidade de biomassa do biofilme, que compreende hifas e material polimérico extracelular, assim, quanto maior a quantidade de material biológico, maior o nível de coloração e absorbância (MOWAT et al. 2007).

Foi observado que, no período de 48 horas de crescimento, a estrutura formada era característica de biofilme maduro, com uma camada basal de esporos, uma intermediária de hifas e todo este conjunto recoberto por uma MEC (GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2016; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008; SINGHAL et al., 2011); enquanto que após este período de tempo, o biofilme demonstrava sinais de inviabilidade, como ruptura e fragilidade da estrutura, provavelmente pela atuação de moléculas envolvidas no *quorum-sensing*, praticamente cessando o crescimento, estando de acordo com os resultados obtidos por Beauvais et al. (2007), Mowat et al. (2007) e Shopova et al. (2013). Por esse motivo, as demais análises foram realizadas com biofilme de 48 horas.

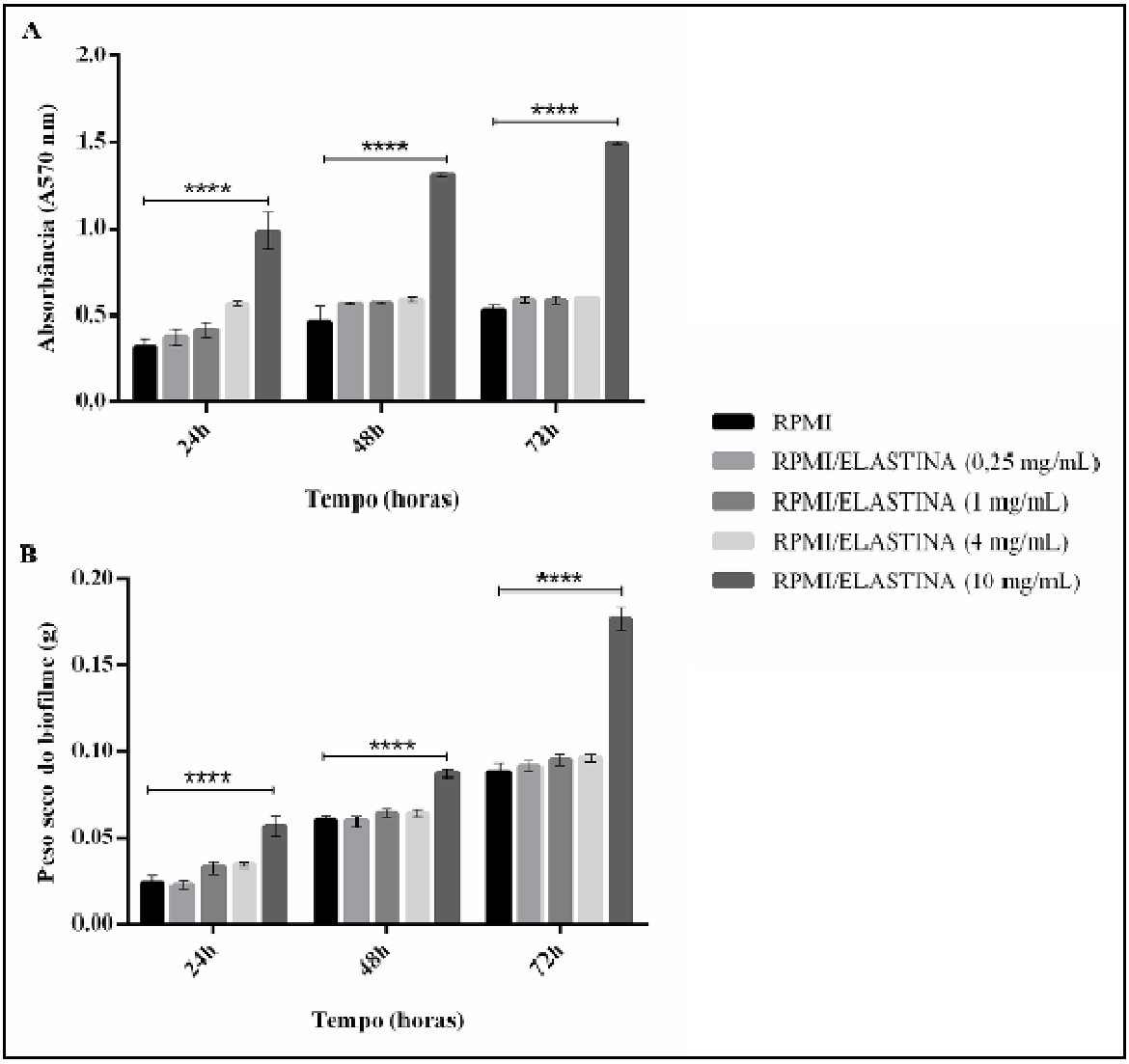
3.2 PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *A. fumigatus* NA PRESENÇA DE ELASTINA

Para avaliação da influência da elastina na produção do biofilme de *A. fumigatus*, foram selecionadas os isolados URM 5992 e URM 6573, representantes de isolados ambientais e de espécimes clínicos, respectivamente, por apresentarem maior produção de

biofilme. A adição de elastina ao meio, na concentração de 10 mg/mL, promoveu aumento na produção de biofilme (p<0,0001) em todos os períodos de tempo analisados (Gráfico 2), não havendo diferenças entre as outras concentrações, dentro de cada período de tempo estudado.

O meio de cultura RPMI é o que mais tem sido utilizado para proporcionar o crescimento e desenvolvimento de biofilme de *A. fumigatus*, pois é rico em nutrientes e possui em sua constituição diversos aminoácidos e vitaminas. Pesquisas têm demonstrado que a adição de novos componentes a este meio pode auxiliar na mimetização das condições encontradas no hospedeiro durante a infecção e pode ter sido a razão para o aumento da produção de biofilme observado neste estudo (BRUNS et al., 2010b; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008; SHOPOVA et al., 2013).

Gráfico 2 – Influência da elastina no crescimento do biofilme de *Aspergilllus fumigatus.* Média da produção de biofilme pela absorbância com cristal violeta 0,5% (A) e peso seco (B) dos isolados URM 5992, origem ambiental, e URM 6573, origem clínica, de *A. fumigatus*.



****p< 0,0001; h – horas.

Até o presente estudo, a influênica de constituintes pulmonares, como a elastina, no desenvolvimento do biofilme de *A. fumigatus*, não havia sido avaliada; e como esperado, a adição desta proteína promoveu aumento da biomassa em 100% após 48 horas, quando comparado ao RPMI sozinho (9,4 mg), atingindo 18,8 mg em 72 horas de desenvolvimento, sugerindo fortemente a influência deste constituinte pulmonar no desenvolvimento do biofilme de *A. fumigatus.* Assim como neste estudo, Toyotome et al. (2012) e Shopova et al. (2013), respectivamente, demonstraram a influência de fatores do hospedeiro como a fetuína A, uma proteína sérica, e DNA extracelular na promoção do crescimento do biofilme de *A. fumigatus*.

O peso seco observado neste estudo em 72 horas (18,8 mg) é mais que duas vezes o valor observado por Seidler, Salvenmoser e Müller (2008), de 8,3 mg, durante o mesmo período de tempo em biofilme formado em cocultura com células brônquicas epiteliais. Entretanto, no estudo conduzido por Toyotome et al. (2012) o biofilme de *A. fumigatus,* na presença de constituintes séricos, atingiu 30 mg. Tomando estes fatos como um todo, é possível afirmar que o crescimento e desenvolvimento do biofilme de *A. fumigatus* é influenciado por diversos fatores do hospedeiro.

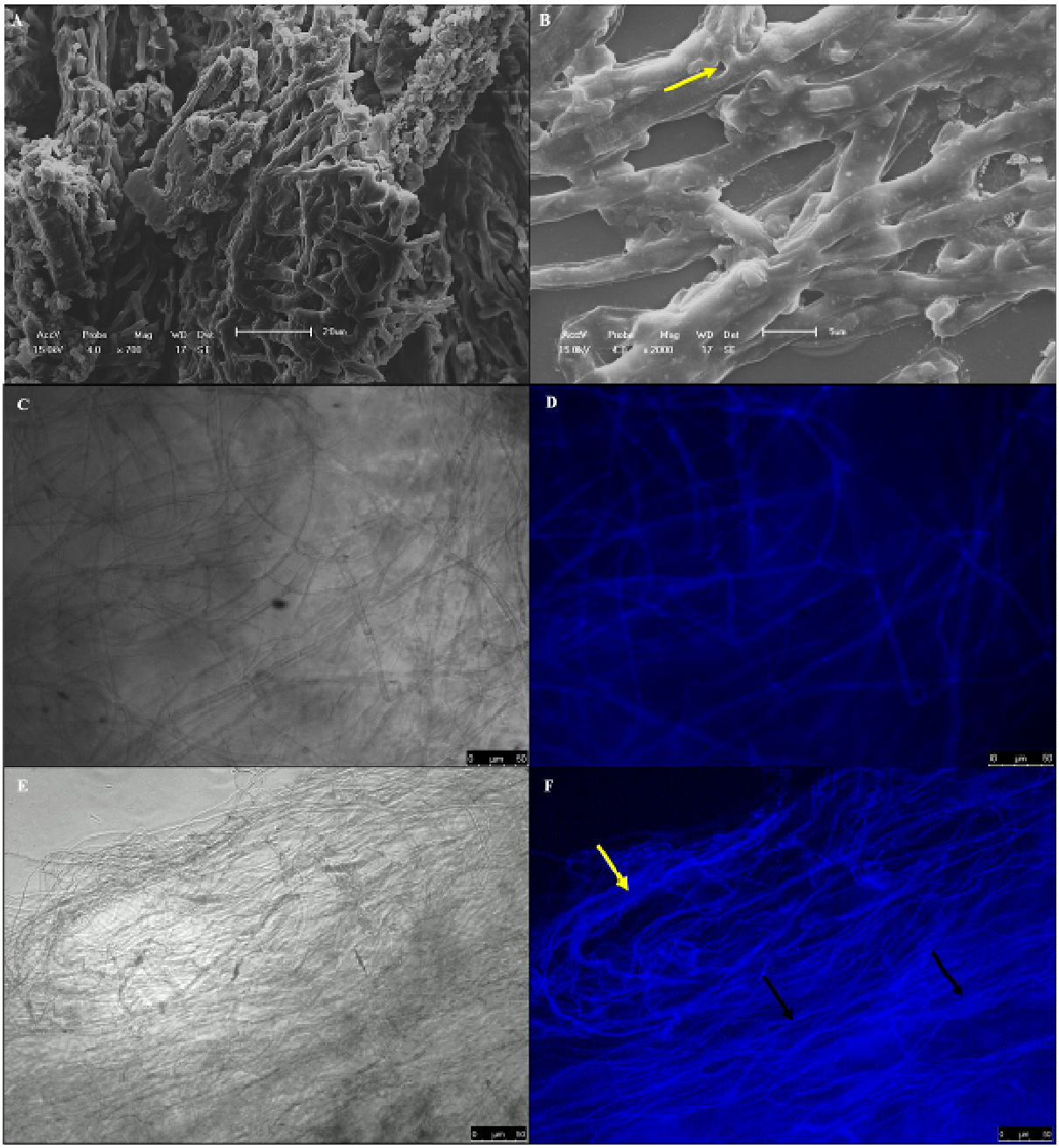
O aumento na produção de biofilme observado no presente estudo pode ser atribuído a vários fatores, primeiramente pelo fato da elastina ser uma proteína abundante no tecido pulmonar e paredes dos vasos sanguíneos, servindo como uma importante fonte de nutrientes para o crescimento fúngico (KHOSRAVI et al., 2012). A atividade elastinolítica é destacada entre os fatores supostamente relacionados à patogenicidade do *A. fumigatus,* pois não apenas a elastina pode servir como importante fonte de nitrogênio para o fungo, como sua degradação leva à degeneração dos tecidos, e consequentemente, invasão do patógeno (BITENCOURT et al*.,* 2016; REMENTERIA et al*.,* 2005). Esta atividade tem sido relatada em outros importantes patógenos pulmonares como *Pseudomonas aeruginosa* (SMITH et al*.,* 2015)

A estabilidade do biofilme foi avaliada neste trabalho pela resistência à força mecânica por meio de sucessivas pipetagens com PBS durante o processo de lavagem. Foi observado que durante as primeiras 24 horas de crescimento, o biofilme se mantinha consistente, mas não estava fortemente aderido às placas; no entanto, após 48 horas o biofilme de *A. fumigatus* crescido em meio contendo elastina foi mais aderente às placas de poliestireno, quando comparado ao RPMI sozinho, tornando difícil sua remoção; fatos consistentes com os observados por Toyotome et al. (2012).

Morfologicamente, foi observado um arranjo complexo, compatível com o biofilme de *A. fumigatus* anteriormente relatado (BEAUVAIS et al*.,* 2007; GONZÁLEZ-RAMÍREZ et

al., 2016; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008) e a presença de anastomose das hifas, também observada por González-Ramírez et al. (2016) (Figura 4). O arranjo das hifas foi semelhante ao descrito por Seidler, Salvenmoser e Müller (2008) e González-Ramírez et al. (2016), que observaram que hifas arranjadas em feixes paralelos reforçam a estrutura, enquanto que as hifas entrelaçadas a estabilizam. Adicionalmente, foi constatada a presença de arranjos circulares, também relatados por Beauvais et al. (2007) e González-Ramírez et al. (2016), indicando a possível formação de canais para circulação de ar, os quais podem estar relacionados à origem de processos oxidativos responsáveis pela produção de melanina, um constituinte da MEC do biofilme de *A. fumigatus* (BEAUVAIS et al., 2007; LOUSSERT et al., 2010) (Figura 4).

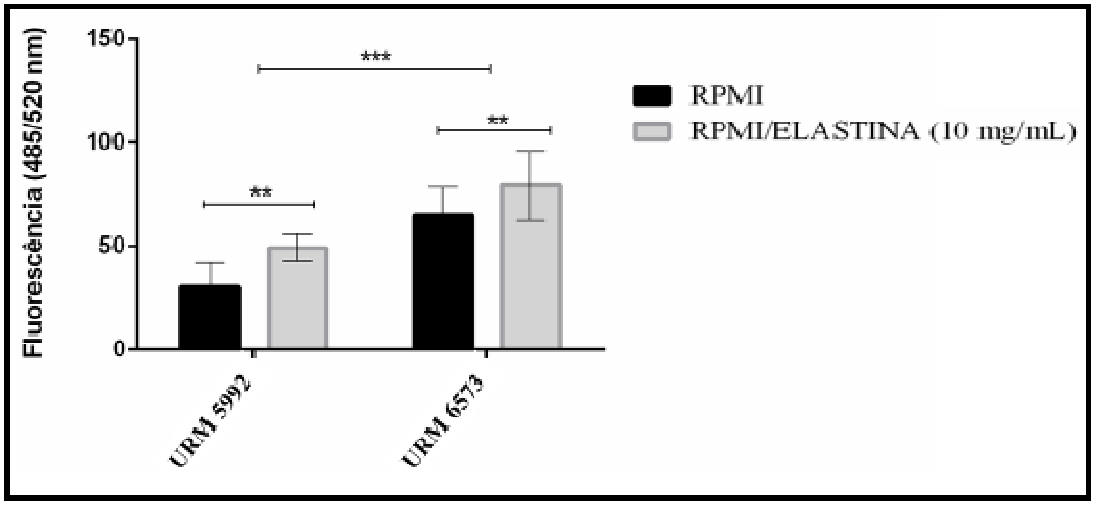
Figura 4 – Influência da elastina no crescimento do biofilme de *Aspergilllus fumigatus*. Fotomicrografia do biofilme de *A. fumigatus* URM 6573, 48 horas a 37 ºC em meio RPMI adicionado de 10 mg/mL de elastina, evidenciando sua complexa estrutura (A) e anastomose das hifas (B) (seta amarela). Biofilme de *A. fumigatus,* 48 horas a 37 ºC, em RPMI, sob microscopia de luz visível (C) e corado com Calcofluor White ® (D); Biofilme de *A. fumigatuas* em RPMI adicionado de 10 mg/mL de elastina sob microscopia de luz visível (E) e corado com Calcofluor White® (F), evidenciando arranjos circulares (seta amarela) e feixes paralelos de hifas (setas pretas). Aumento de 400 x. Barra de escala de 50 µm.



3.3 PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR NO BIOFILME DE *A. fumigatus*

Nossos resultados demonstraram que a presença de elastina (10 mg/mL) no meio de cultura RPMI, aumenta a quantidade de MEC produzida por *A. fumigatus* quando comparada ao RPMI sozinho (p=0,0042) (Gráfico 3). Isso faz com que o biofilme se torne mais coeso, como evidenciado nas fotomicrografias (Figura 5). Estes fatos indicam fortemente que a elastina, constituinte pulmonar e de vasos, estimula *A. fumigatus* a desenvolver mecanismos de evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, houve diferença na produção de MEC entre os isolados (p<0,0001). *A. fumigatus* URM 6573 produziu mais MEC durante o desenvolvimento do biofilme do que o URM 5992, entretanto, o número amostral não é suficiente para extraploção para os grupos clínico e ambiental, aos quais estes isolados pertencem.

Gráfico 3 – Influência da elastina na produção de matriz extracelular (MEC) no biofilme de *Aspergillus fumigatus.*



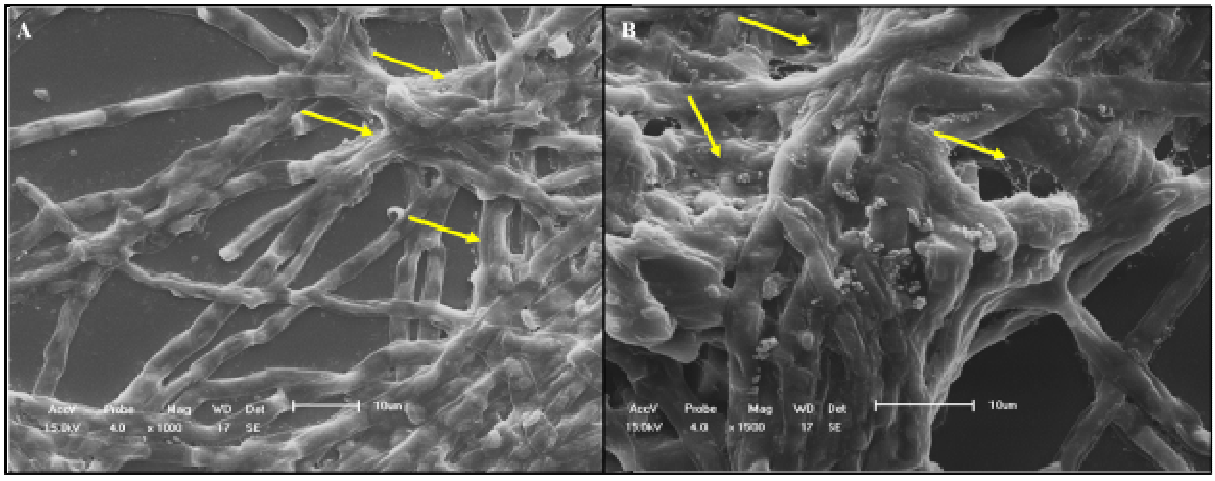
URM= University Recife Mycology (Micoteca URM); **p<0,01; ****p<0,0001.

O aumento da MEC na presença de elastina pode estar relacionado à maior disponibilidade de nutrientes, e acompanhou o aumento da produção de biofilme, sendo consistente com os resultados relatados por Seidler, Salvenmoser e Müller (2008), os quais observaram que a maior produção de MEC está relacionada à grande quantidade de biofilme. Este aumento na quantidade de MEC quando adicionado fatores que, possivelmente, estão envolvidos na formação e crescimento do biofilme de *A. fumigatus in vivo*, como DNA

extracelular e proteínas séricas, como a fetuína A, também foi evidenciado anteriormente (SHOPOVA et al., 2013; TOYOTOME et al., 2012). Ademais, sugere-se que este processo seja fortemente influenciado por fatores do hospedeiro, uma vez que esta matriz também está presente no aspergiloma, proporcionando maior estabilidade à rede de hifas (LOUSSERT et al., 2010).

Foi observado que a MEC se encontra difundida entre as hifas (Figura 5), tornando o biofilme mais coeso, fato que tem sido demonstrado em estudos anteriores (BEAUVAIS et al., 2007; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008).

Figura 5 – Fotomicrografia de biofilme de *Aspergilllus fumigatus* URM 6573, em 48 horas a 37 ºC, em RPMI (A) e RPMI suplementado com 10 mg/mL de eslastina (B), evidenciando maior produção de matriz extracelular na presença de elastina. Aumento de 1000 x e 15000 x, respectivamente.



O desenvolvimento da MEC é quase imperceptível até às 16 horas de crescimento do biofilme; contudo, após 20 horas, está presente em toda a superfície da cultura e vai aumentando de espessura conforme a idade da colônia vai avançando (BEAUVAIS et al., 2007), entretando em coculturas de células do epitélio bronquial, a MEC é formada após 24 horas (SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008).

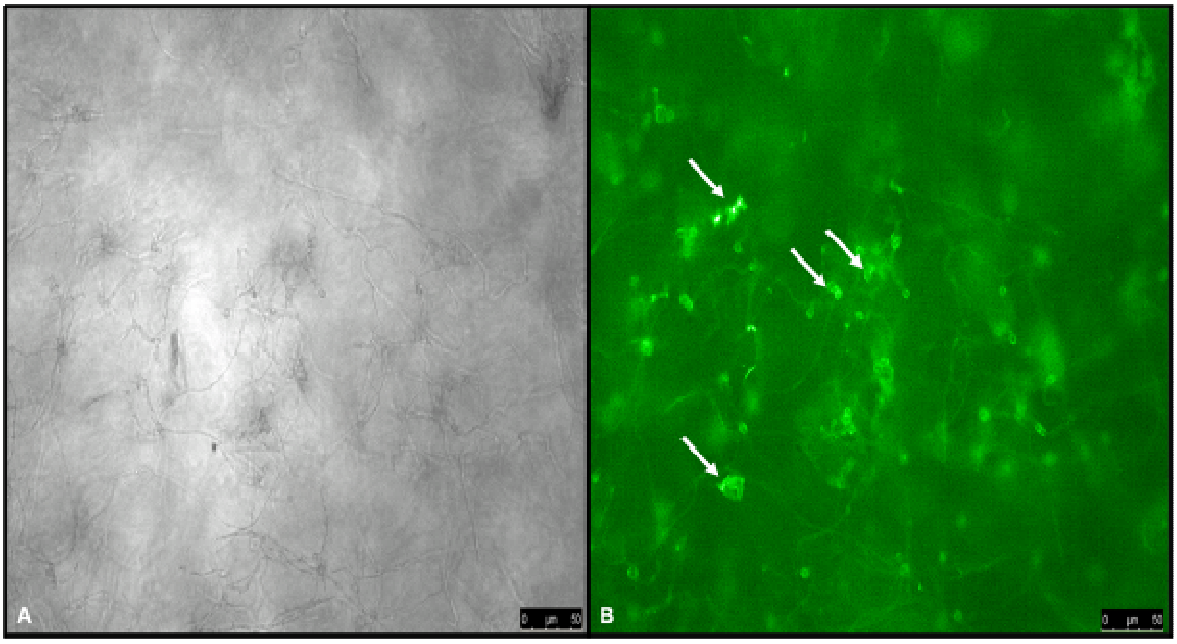
A MEC é compontente essencial para o desenvolvimento do biofilme, pois envolve o conjunto de hifas, mantendo-as juntas e fixas à superfície. Além disso, fornece proteção contra agressões externas, como a ação das células do sistema imunológico do hospedeiro bem como dos agentes antifúngicos (LOUSSERT et al., 2010; MÜLLER; SEIDLER; BEAUVAIS, 2011; RAJENDRAN, 2013).

Forte marcação pela CAAF foi constatada, principalmente, nas extremidades das hifas (Figura 6), apresentando aspecto de material amorfo em torno destas. De acordo com observações anteriores (BEAUVAIS et al., 2007; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER,

2008; SHOPOVA et al., 2013), a MEC também foi mais evidenciada nestas regiões, sugerindo que esta não só recobre e protege a estrutura como um todo, mas tem a função de conectar as extremidades das hifas umas as outras (SHOPOVA et al., 2013).

Uma vez que esta matriz é originalmente composta por carboidratos, sendo a glicose responsável por 74% (± 6%) da fração de monossacarídeos (BEAUVAIS et al., 2007), a presença de carboidratos, evidenciada pela CAAF por meio da marcação de resíduos de α-manopiranosil e α-glucopiranosil dos polissacarídeos, sugere que sua disponibilidade na MEC é resultante da necessidade de prover nutrição às hifas que compõe o biofilme, especialmente aquelas que se encontram mais distantes da fonte de nutrientes (MOWAT et al., 2007; SHOPOVA et al., 2013).

Figura 6 – Biofilme de *Aspergillus fumigatus* URM 6575 em RPMI acrescido de 10 mg/mL de elastina, 48 horas a 37 ºC, sob microscopia de luz visível (A) e marcado com Alexa Fluor® 488 (CAAF, Life Technologies, Alemanha) (B), evidenciando maior quantidade de matriz extracelular nas extremidades das hifas (Setas brancas). Aumento de 400 x. Barra de escala de 50 µm.



O aumento na produção de MEC evidenciada no presente estudo, pode ser resultante de estímulo do ambiente pulmonar ao *A. fumigatus,* visto que a elastina é um importante constituinte pulmonar e de vasos sanguíneos; fortemente apoiado pelo fato da MEC também está presente no aspergiloma, podendo desempenhar um importante papel na resistência aos antifúngicos, por meio da sua absorção, prevenindo, assim, a difusão do fármaco (LOUSSERT et al., 2010; MOWAT et al., 2008; SEIDLER; SALVENMOSER; MÜLLER, 2008). Além disso, o ambiente pulmonar pode fazer com que o *A. fumigatus* desenvolva

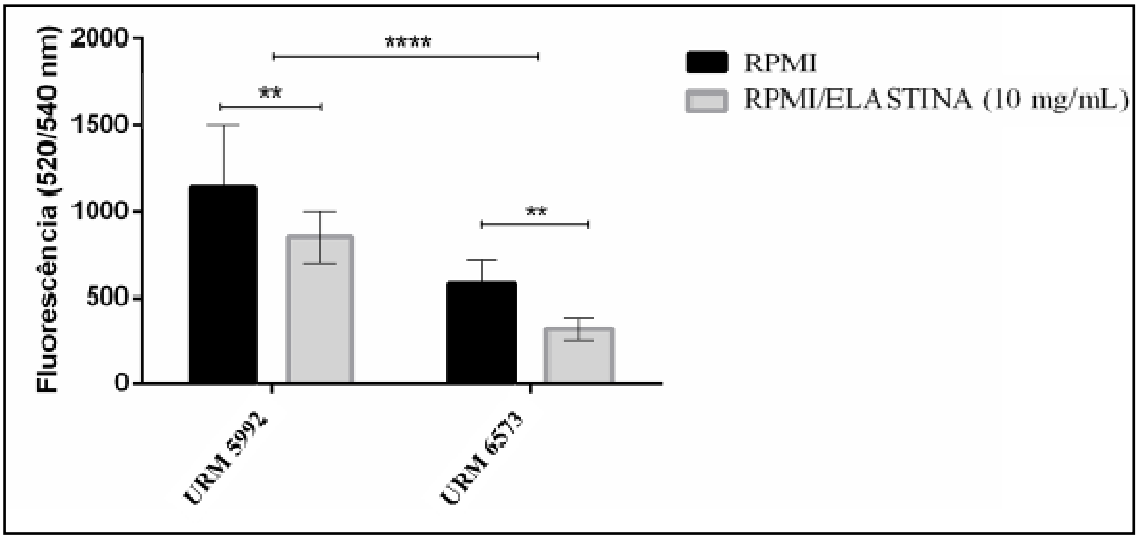
mecanismos de sobrevivência, visto que esta matriz é composta também por toxinas, como a GT, capaz de induzir apoptose em macrófagos, LPMNs e células dendríticas; bem como de melanina, pigmento que protege o fungo contra o estresse oxidativo (BEAUVAIS et al., 2007; BRUNS et al., 2010a; COMERA et al., 2007; SCHRETTL et al., 2010), pois como sugerido, o ambiente pulmonar parece selecionar os isolados que melhor se adaptam (DE VALK et al., 2007; GUINEA et al., 2011).

3.4 HIDROFOBICIDADE DO BIOFILME DE *A. fumigatus*

Neste estudo foram observadas propriedades hidrofóbicas distintas no biofilme de *A. fumigatus* desenvolvido em RPMI e RPMI com elastina (10 mg/mL), sendo o primeiro mais hidrofóbico que o segundo (p=0,005), além de ser constatada diferença entre os isolados (Gráfico 4), no entanto, assim como para MEC, não é possível extrapolar os resultados obtidos entre os isolados, para os grandes grupos aos quais pertencem. Esta diferença foi demonstrada pela interação do biofilme com microesferas de látex de sulfato modificado laranja (0,806 μm). As microesferas de látex apresentam uma baixa densidade de cargas negativas, com mais de 90% de sua superfície disponível para interações hidrofóbicas (HAZEN; HAZEN, 1987).

A primeira etapa para o estabelecimento da colonização de um substrato pelo fungo é a adesão, a qual se dá por meio de diversas interações estabelecidas entre os conídios e a superfície do substrato (RAMAGE et al., 2011). Apesar da importância do processo de adesão, pouco se sabe a respeito (SHEPPARD, 2011). Diversos estudos têm focado, principalmente, na parede celular fúngica, dando ênfase às proteínas, em especial às hidrofobinas, as quais são responsáveis pela alta hidrofobicidade dos conídios. Estas proteínas estabilizam a adesão dos esporos às superfícies hidrofóbicas tanto naturais como artificiais, possivelmente gerando sinais morfogênicos (LINDER et al., 2005; RAMAGE et al., 2011a).

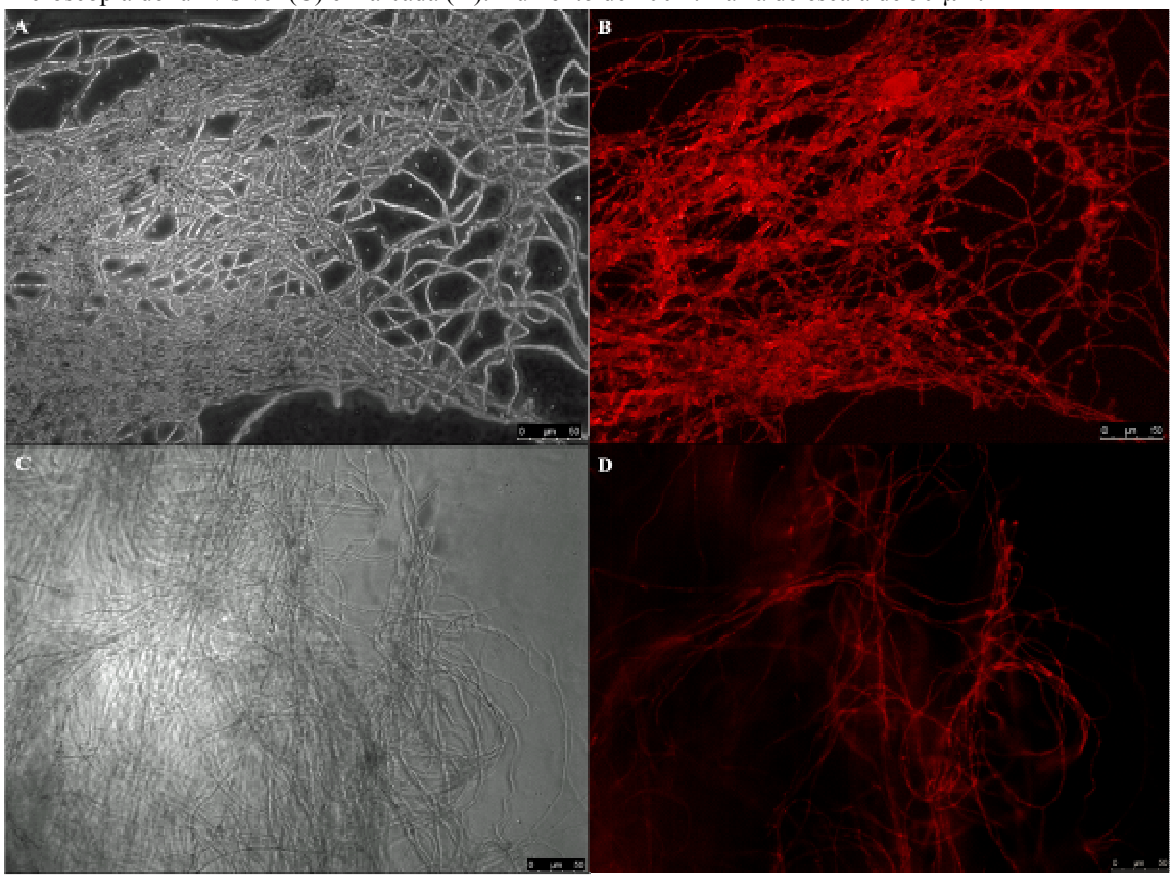
Gráfico 4 – Influência da elastina na hidrofobicidade do biofilme de *Aspergilus fumigatus.*



URM= University Recife Mycology (Micoteca URM); ***p*<0,01; ****p*<0,0001

As hidrofobinas são responsáveis pela característica hidrofóbica da MEC (BEAUVAIS et al., 2007; DAGUE et al., 2008; PARIS et al., 2003), além dos genes que as codificam apresentarem maior nível de expressão durante o desenvolvimento do biofilme (BRUNS et al., 2010b; GIBBONS et al., 2012). Desta maneira, esperava-se que a adição de elastina, que promoveu um aumento da matriz, também causaria aumento na hidrofobicidade; entretanto, o resultado obtido neste trabalho foi de encontro ao esperado. Neste ensaio pode ser observado um grande número de esferas aderidas ao biofilme crescido apenas em RPMI, enquanto que na presença de elastina, essa hidrofobicidade foi diminuída (Figura 7).

Figura 7 – Biofilme de *Aspergillus fumigatus* URM 5992 em RPMI, 48 horas a 37 ºC, sob microscopia de luz visível (A) e marcada com microesferas de látex (B); e de biofilme na presença de elastina, sob microscopia de luz visivel (C) e marcada (D). Aumento de 400 x. Barra de escala de 50 µm.



A modificação da hidrofobicidade constatada neste estudo, pode ser explicada, em parte, pela influência de um fator presente no hospedeiro, a elastina. Constatou-se que para condições ambientais como temperatura, fonte de nutrientes e umidade (VALDIVIA; HEITMAN, 2007), bem como as condições em que o microrganismo é cultivado, isto é, em meios sólidos ou líquidos e em biofilmes, ocorre a modificação da hidrofobicidade do micélio do fungo (BEAUVAIS et al., 2007; EPSTEIN et al., 2011; SIQUEIRA; LIMA, 2012).

Outro ponto importante que pode explicar a diferença de hidrofobicidade na presença de elastina, é o fato de que as hidrofobinas estão presentes no micélio aéreo e conídios dos fungos filamentosos, tornando a superfície hidrofóbica e resistente à umidade, facilitando, assim, a dispersão de esporos no ar, sendo essenciais para estes fungos completarem seu ciclo biológico (BAYRY et al., 2012; KWON-CHUNG; SUGUI, 2013). Desta maneira, quando inserido em uma comunidade no ambiente pulmonar, *A. fumigatus,* não necessitaria dispensar grande quantidade de energia na produção de proteínas dispersantes.

Contudo, outros papéis podem ser assumidos pelas hidrofobinas, como foi demonstrado para a proteína RodAp, a qual encontra-se ativamente relacionada aos processos

de evasão deste fungo frente às células do sistema imunológico do hospedeiro, bem como sua ausência implica na diminuição da virulência de *A. fumigatus* (AIMANIANDA et al., 2009; BRUNS et al., 2010a; DAGENAIS et al., 2010). Serão necessários mais estudos para elucidar os papéis biológicos que estas proteínas podem desenvolver, especialmente no contexto da relação parasita-hospedeiro. O exposto sugere fortemente que pode ser necessária a atuação em conjunto de diversos fatores do hospedeiro para expressão destas proteínas.

3.5 INFLUÊNCIA DA ELASTINA NA PRODUÇÃO DE GLIOTOXINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE *A. fumigatus*

Dois isolados de *A. fumigatus* foram avaliados quanto a produção de GT durante o desenvolvimento do biofilme, o isolado URM 3812 (origem ambiental) e URM 6573 (origem de espécimes clínicos); embora em *screen* realizado por Moraes (2015) tenha sido observado que o isolado URM 3812, mas não o URM 6573, produz GT, chegando a 0,150 mg/mL, sob agitação. Entretanto, neste trabalho foi admitida a análise do isolado URM 6573 para avaliação da influência da elastina não só no aumento ou diminuição da produção de GT durante o desenvolvimento do biofilme, como também para verificação indireta de seu possível papel na ativação dos genes responsáveis pela biossíntese desta toxina, justificando-se pelo fato de que os estímulos externos que induzem a produção de GT permanecem desconhecidos.

Apesar da transcrição dos genes envolvidos na produção de GT ser afetada por vários fatores, como pH, temperatura, composição e aeração do meio de cultura, ou por fatores desconhecidos durante a infecção de cobaias ou durante o confronto de *A. fumigatus* com granulócitos neutrofílicos (MCDONAGH et al., 2008; SUGUI et al., 2008); não foi observada produção de GT pelo isolado URM 6573, na condição de biofilme em nenhum dos períodos de tempo analisados, embora existam relatos da capacidade da elastina modular genes envolvidos em processos biológicos, os quais podem estar relacionados ao estabelecimento de infecção, como demostrado para *Trichophyton rubrum* (BITTENCOURT et al., 2016).

Diferenças na produção desta toxina entre isolados de *A. fumigatus* tem sido previamente relatadas (KUPFAHL et al., 2008). A freqüência média da produção em cepas ambientais de *A. fumigatus* varia entre 0% e 33%, podendo chegar a 96%, e entre cepas clínicas de 93% a 98% (EL-SHANAWANY; MOSTAFA; BARAKAT, 2005; KUPFAHL et al., 2008; SCHARF et al., 2012).

Para o isolado URM 3812, não foi possível a detecção de GT no período de 24 horas de desenvolvimento do biofilme, enquanto que em 48 horas foi detectada grande quantidade da micotoxina, com diminuição da mesma em 72 horas (p<0,01) (Tabela 5). Diferentemente, no estudo conduzido por Bruns et al. (2010b), observou-se uma produção de 0,75 mg/L de GT em 24 horas de crescimento, o que pode estar relacionado à sensibilidade do equipamento utilizado. Contudo, a quantidade de GT detectada no biofilme do isolado URM 3812 em RPMI, em 48 horas, no presente estudo, foi superior em 13 vezes àquela detectada por Bruns et al. (2010b), no mesmo período de tempo (0,012 mg/mL).

Tabela 5 – Média da produção de gliotoxina durante o desenvolvimento do biofilme do *Aspergillus fumigatus* URM 3812 ao longo do tempo.

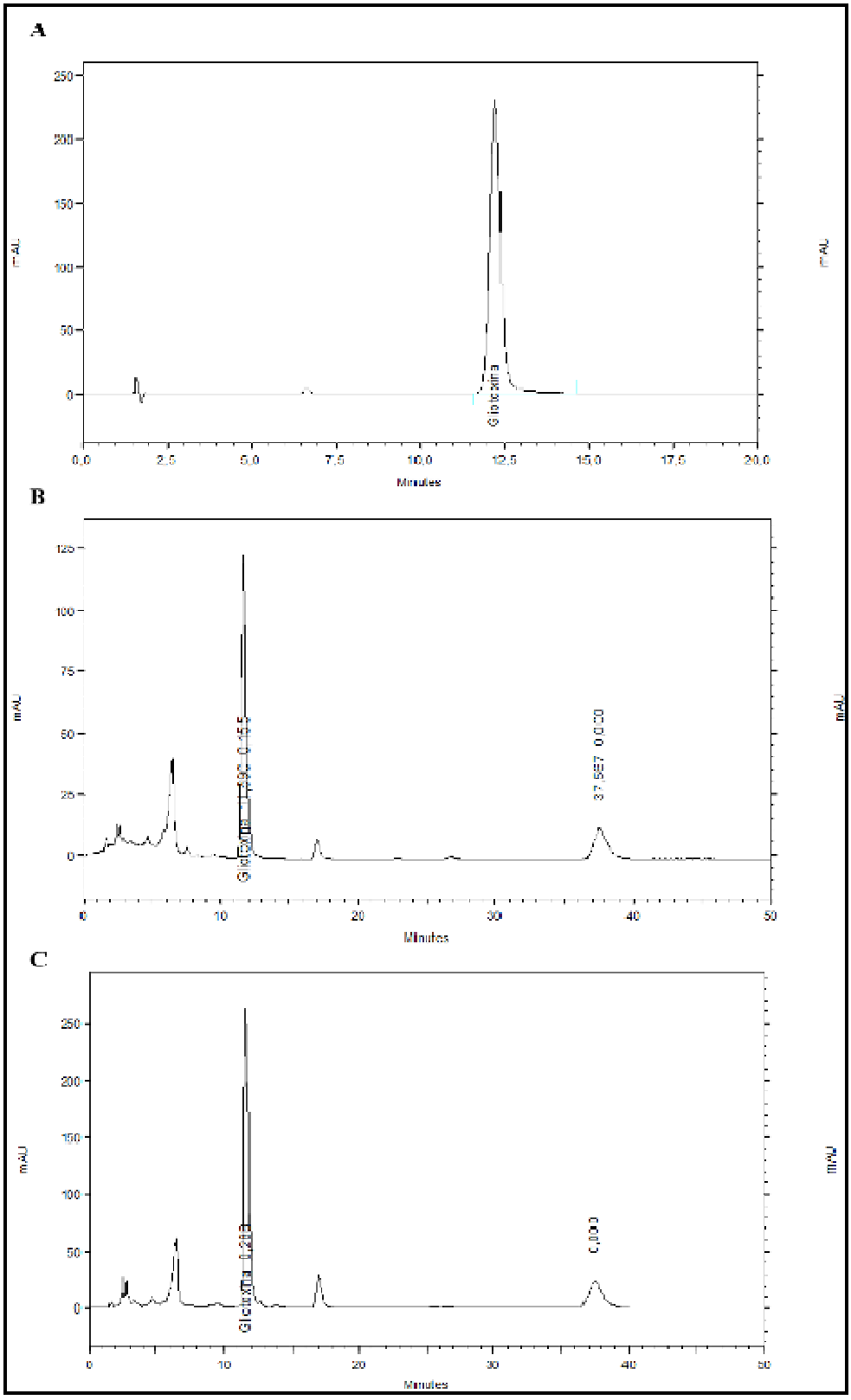
Condição	**Concentração de gliotoxina (mg/mL) - Média (DP)**		
	24 horas	48 horas	72 horas
RPMI	0^{aA}	$0{,}156\ (0{,}004)^{bA}$	$0{,}134\ (0{,}003)^{cA}$
RPMI/Elastina (10 mg/mL)	0^{aA}	$0{,}291\ (0{,}008)^{bB}$	$0{,}191\ (0{,}005)^{cB}$

Médias acompanhadas de letras iguais, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Neste trabalho observou-se que a elastina foi capaz de induzir aumento de quase duas vezes a quantidade de GT produzida durante o desenvolvimento do biofilme de *A. fumigatus* URM 3812*,* quando comparada ao desenvolvimento em RPMI sozinho (p<0,0001), em 48 horas; e de aproximadamente uma vez e meia, em 72 horas. Estudos demonstram o aumento em mais de três vezes nos níveis de expressão de genes envolvidos na biossíntese de GT após 48 horas de desenvolvimento do biofilme (BRUNS et al*.,* 2010b).

Foi possível a identificação de picos no cromatograma, que apresentaram o mesmo tempo de retenção do observado para o controle de GT pura (TR = 11,9 minutos) (Figura 8). Adicionalmente, picos representativos de substâncias não identificadas, também foram visualizados, supostamente pertencentes a outros metabólitos ou ao derivado inativo de GT, o bis(metiltio)-gliotoxina (bmGT) (BUGLI et al*.,* 2014; DOMINGO et al*.,* 2012).

Figura 8 – Cromatogramas do padrão de gliotoxina pura (A); da gliotoxina produzida durante o desenvolvimento do biofilme de *Aspergillus fumigatus* URM 3812 em RPMI (B) e em RPMI com 10 mg/mL de elastina (C), pós 48 horas a 37 °C.



Poucos estudos têm avaliado a influência de fatores do hospedeiro na produção de GT durante o desenvolvimento de biofilme de *A. fumigatus*. Em 2014, Bugli et al. conduziram uma pesquisa para determinar a produção desta toxina durante o biofilme de *A. fumigatus* em cocultura com células do epitélio pulmonar humano; sendo detectada 0,0096 mg/mL de GT, valor trinta vezes inferior aos detectados no presente estudo (0,291 mg/mL) quando analisado o biofilme na presença da elastina.

O aumento observado na presença de elastina pode estar relacionado a maior oferta de nutrientes, sendo a elastina uma fonte de nitrogênio, para produção de biomoléculas; bem como estar diretamente relacionado a quantidade aumentada de biofilme produzido, aqui demonstrada, o que pode levar a modificação na composição e quantidade de metabólitos secretados (BRUNS et al*.,* 2010b).

Ainda é possível que a elastina esteja envolvida em processos de reprogramação genética do biofilme, pois este, quando comparado à células planctônicas, cresce com uma notável reprogramação genética, pois genes que estão envolvidos na sinalização celular e biossíntese de proteínas e aminoácidos são reprimidos, ao passo que genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários aumentaram consideravelmente sua expressão (BURNS et al*.,* 2010b). Carecendo de mais estudos para elucidação do papel da elastina na virulência do *A. fumigatus.*

Visto que a GT é um importante fator de virulência *in vivo,* com ação imunossupressora e tóxica ao epitélio ciliado respiratório humano; a descoberta de fatores do hospedeiro, mais precisamente de constituintes pulmonares, como a elastina, influenciando a produção desta toxina, pode explicar, em parte, a evasão aos mecanismos de defesa pelo *A. fumigatus* e, consequente, progressão da doença (HOHL; FELDMESSER, 2007; KUPFAHL et al., 2008). Além disso, o aumento da GT provocado por fatores do hospedeiro poderia explicar sua detecção *in vivo* em hospedeiros infectados por *A. fumigatus* (BOK et al*.,* 2005; LEWIS et al*.,* 2005a).

3.6 MODELO EXPERIMENTAL DE ASPERGILOSE PULMONAR

Modelos animais têm sido utilizados na avaliação novos testes e marcadores diagnósticos e novas drogas para tratamento da AI; além de serem importantes ferrametas para avaliar a patogenicidade e virulência de microrganismos (GRAVELAT et al., 2008; PATTERSON, 2005; SCHUMANN et al., 2010; SUGUI et al., 2008).

Para a avaliação da patogenicidade dos isolados de *A. fumigatus*, foram selecionados os isolados URM 6573, maior produtor de biofilme e não produtor de GT; e URM 3812, menor produtor de biofilme e produtor de GT.

Visto que *A. fumigatus* é um fungo oportunista, a imunossupressão foi necessária para estabelecer aspergilose pulmonar nos camundongos. Não houve mortalidade provocada pelo regime de imunossupressão com ciclofosfamida (150 mg/Kg), o que demonstrou a viabilidade do tratamento imunossupressor, sendo constatada sua eficácia a partir da análise de hemogramas, nos quais foi possível observar a queda dos valores absolutos e relativos de neutrófilos comparados a animais saudáveis, variando de 70% a 90% dos valores de referência (Anexo B e C). Assim a escolha da droga e do regime de imunossupressão foi primordial para estabelecer com sucesso a doença e sobrevivência dos animais.

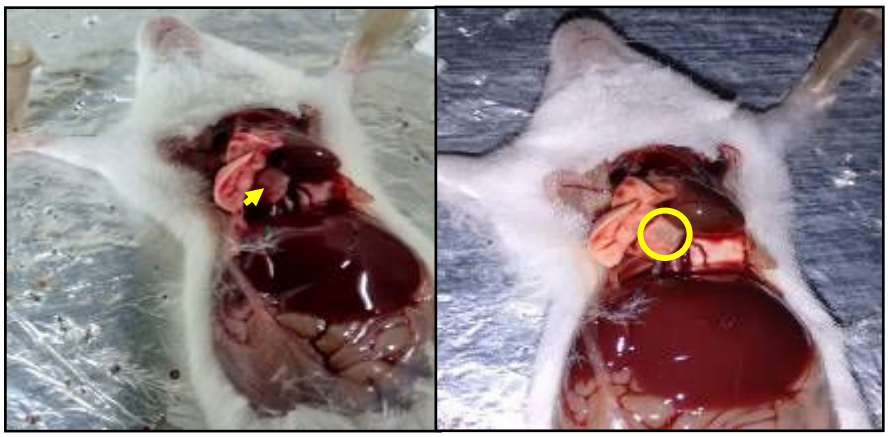
Os dados obtidos neste trabalho confirmam a proposta de Huyan et al. (2011), na qual a imunossupressão ideal para camundongos foi induzida por duas injeções intraperitoneais de ciclofosfamida a 150 mg/Kg, sendo passível de estabelecer um modelo animal para estudos com fungos oportunistas, como espécies de *Aspergillus, Cryptococcus* e *Candida*.

Corroborando o observado por Huyan et al. (2011), todos os animais analisados apresentaram letargia, pelagem sem brilho, relutância em atividade ambiental, piloereção e redução da ingestão de alimentos e água no primeiro dia após a primeira injeção de ciclofosfamida, sendo lentamente restaurados.

Neste trabalho, não foi infligido dano por trauma de inoculação à nenhum dos animais, como destacado por Miller et al. (2012), a instilação intranasal é um procedimento vantajoso por ser de fácil execução e não traumático para o animal, podendo ser largamente utilizado para ensaios farmacêuticos e testes de vacinas, o que foi verificado neste estudo, no qual esta via de inoculação não invasiva preveniu a morte por inoculação traumática e proporcionou o estabelecimento da doença.

Após a eutanásia, foi observado o estado geral da caixa torácica e pulmões, sendo constatada hiperemia dos órgãos dos animais infectados quando comparados aos animais apenas imunossuprimidos, além da presença de regiões pálidas, indicando possíveis focos de infecção (Figura 9).

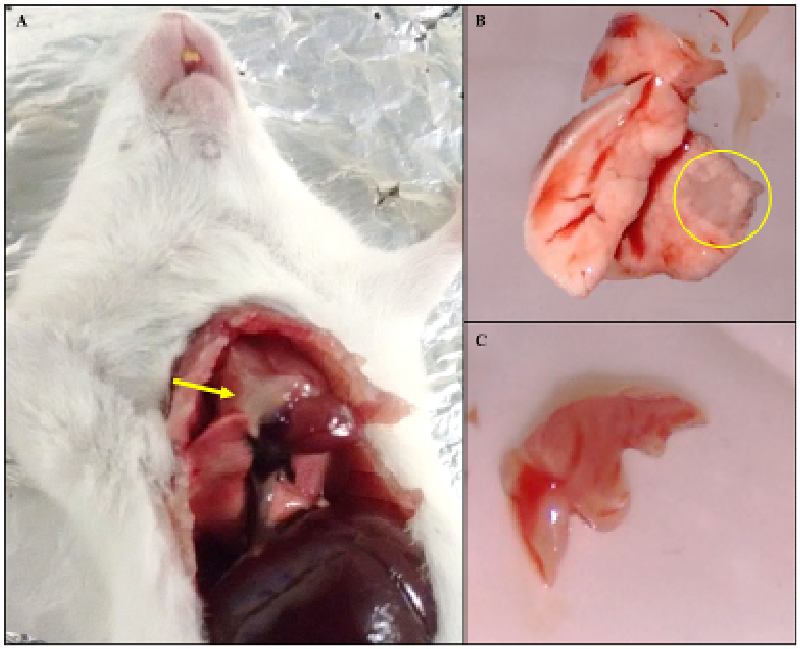
Figura 9 – Animal eutansiado após 48 horas de infecção, com exposição de órgãos, apesentando regiões de aspecto opaco (seta e círculo amarelos), indicando possível foco de infecção pulmonar.



Ambos os isolados de *A. fumigatus*, URM 6573 e URM 3812, foram capazes de produzir doença nos animais imunossuprimidos, e foram igualmente capazes de induzir resposta inflamatória maciça, que foi visualizada nos cortes de tecido pulmonar. Estes achados reforçam que a virulência de *A. fumigatus* é multifatorial, além disso, a produção e liberação de fatores de virulência é dependente das condições do hospedeiro (ASKEW; KONTOYIANNIS; CLEMONS, 2014; BEN-AMI; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2010; CHOTIRMALL et al., 2014; SALES-CAMPOS et al., 2013).

Todavia, nos animais infectados pelo isolado URM 3812 foram observadas regiões de opacidade pulmonar, além de áreas de necrose com destruição do tecido pulmonar (Figura 10), fatos não constatados nos animais infectados pelo isolado URM 6573, sugerindo que a GT produzida pelo isolado URM 3812, mas não pelo URM 6573, pode ser um importante fator no desencadeamento de um quadro mais grave de infecção, porém mais estudos devem ser realizados a fim de proporcionar maior compreensão dos múltiplos fatores que influenciam a virulência do *A. fumigatus*.

Figura 10 – Animal infectado pelo isolado URM 3812, eutansiado após 48 horas, com caixa torácica aberta, evidenciando área de necrose pulmonar (A), e lobo pulmonar apresentando opacidade, provável foco de infecção (B). Pulmão de animal infectado pelo isolado URM 6573, com ausência de regiões opacas (C).



Há relatos de inibição da angiogênese durante o desenvolvimento da aspergilose invasiva, pela GT. Em hospedeiros suscetíveis, angioinvasão por *A. fumigatus* causa trombose, hipóxia e liberação de citocinas pró-inflamatórias, os quais são estímulos para a angiogênese. Contudo, proliferação fúngica e extensa necrose coagulativa são particularmente proeminentes neste quadro clínico (BEN-AMI et al., 2009; KONTOYIANNIS, 2010). A supressão do gene *LaeA*, regulador global do metabolismo secundário, aboliu a atividade antiangiogênica de *A. fumigatus*, indicando que este processo é mediado por meio da produção de metabólitos secundários, particularmente, a GT (BEN-AMI et al., 2009), o que poderia explicar a região de necrose pulmonar no animal infectado pelo isolado URM 3812, produtor de GT, mas não no animal infectado pelo URM 6573.

Assim como evidenciado em outros estudos, em todos os períodos de tempo estudados (24, 48 e 72 horas), foram observados filamentos micelianos hialinos, septados com e sem dicotomia (Figura 11) ao exame direto, e recuperação do fungo em cultura, sendo possível a observação do crescimento de colônias de aspecto velutíneo com pontos granulares, cinza-esverdeada, de reverso creme, a partir do terceiro dia de incubação (Figura 12) (AHMAD; AL-SHAIKH; KHAN, 2014). Microscopicamente, foram observados conidióforos de parede lisa e de coloração verde oliva com cabeças conidiais colunares, vesículas em forma de balão

e fiálides unisseriadas, e presença de conídios globosos a subglobosos medindo, aproximadamente, 2,5-3 µm de diâmetro, de coloração verde oliva e superfície ligeiramente equinulada (Figura 12), compatíveis com as características de *A. fumigatus* (PITT; SAMSOM, 2007; SAMSOM et al., 2007a, b, c).

O retrocultivo dos agentes, a partir da inoculação de fragmentos de pulmão dos camundongos infectados confirmam o sucesso do modelo experimental e corroboram os postulados de Henle-Koch, de modo que o agente inoculado reproduziu os sintomas da doença e foi reisolado em cultura pura.

Figura 11 – Exame direto de fragmentos de pulmão clarificado com hidróxido de potássio a 40%, evidenciando filamentos micelianos hialinos, septados dicotômicos (setas) e sem dicotomia, após 48 horas de infecção (400x).

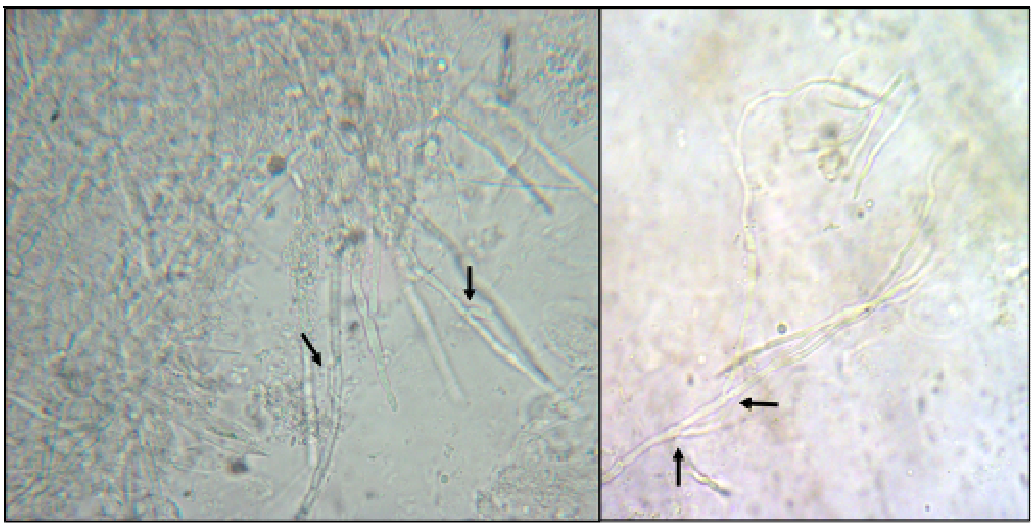
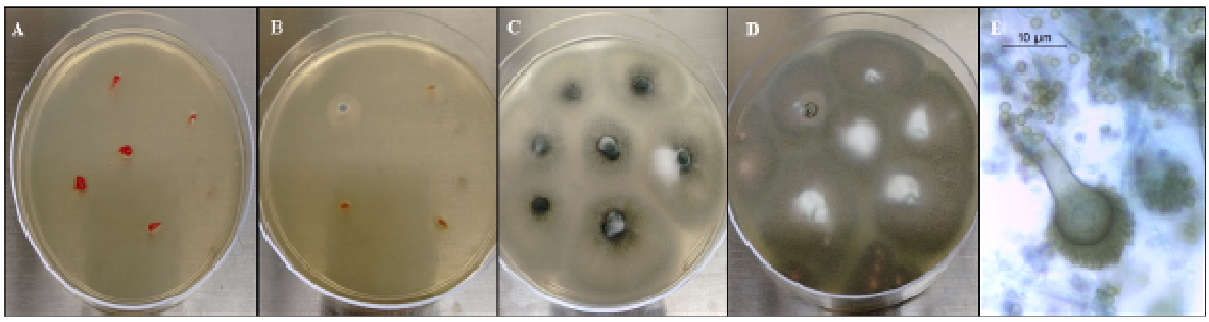


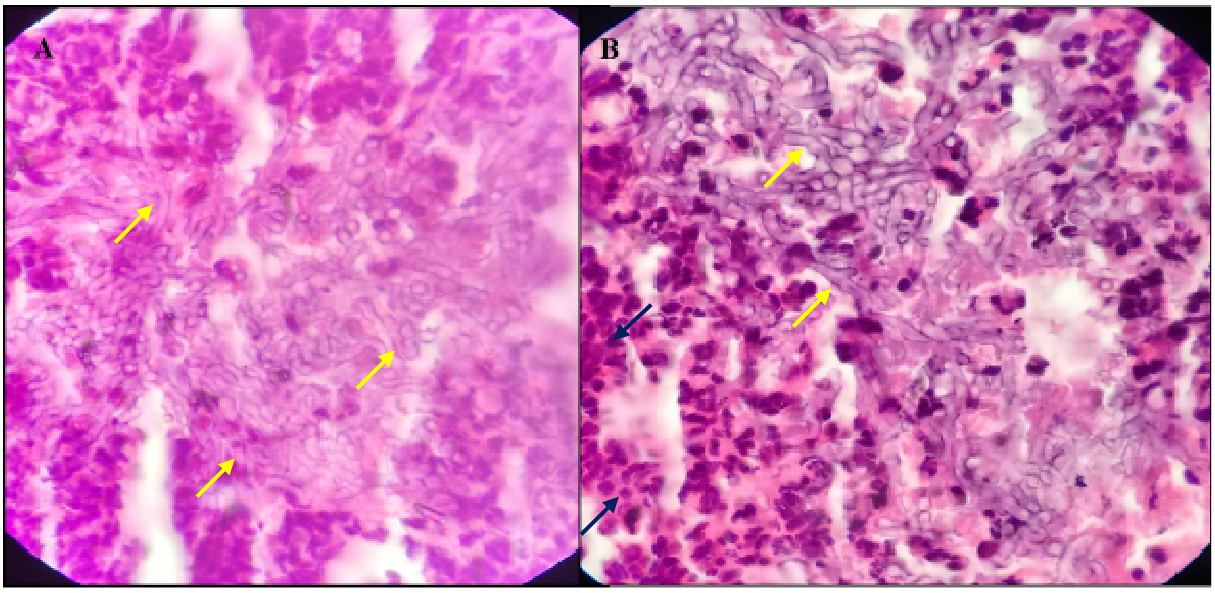
Figura 12 – Placas de Petri com fragmentos de tecido pulmonar de camundongo, após 48 horas de infecção, no tempo 0 (zero) (A), 3 dias (B), 5 dias (C) e 8 dias (D) de inoculação em meio Ágar Sabouraud, mantido a 37 °C. Conídios e parte do conidióforo de *Aspergillus fumigatus* isolado da cultura de fragmentos de tecido pulmonar (1000 x) (E). Barra de escala de 10 µm.



O exame histopatológico dos fragmentos de tecido pulmonar dos camundongos infectados, em todos os períodos de tempo analisados, evidenciou intenso infiltrado neutrofílico e presença de filamentos micelianos hialinos com e sem dicotomia (Figura 13). Assim, essas estruturas fúngicas observadas em parasitismo, visualizadas tanto no exame direto de fragmentos de pulmão quanto no exame histopatológico são compatíveis às descritas para o diagnóstico de aspergilose comprovada (BALLOY et al., 2005; DE PAUW et al., 2008; SHEPPARD et al., 2004a).

A junção dos achados clínicos e laboratoriais permitem a caracterização da aspergilose desenvolvida nos camundongos como aspergilose pulmonar semi-invasiva, caracterizada por ser uma infecção subaguda, indolente e que leva a um processo destrutivo do pulmão (SOUBANI; CHANDRASEKAR, 2002). Diferentemente de outras formas de aspergilose pulmonar, não há necessidade de uma cavidade pré-existente nos pulmões para a instalação da doença, ocorrendo invasão fúngica local no parênquima pulmonar, não havendo invasão vascular e nem disseminação para outros órgãos, sendo necessária redução da imunocompetência local ou sistêmica para o desenvolvimento do fungo e estabelecimento da doença, como induzida nos camundongos com o uso da ciclofosfamida (BARNES; MARR, 2006; ZMEILI; SOUBANI, 2007).

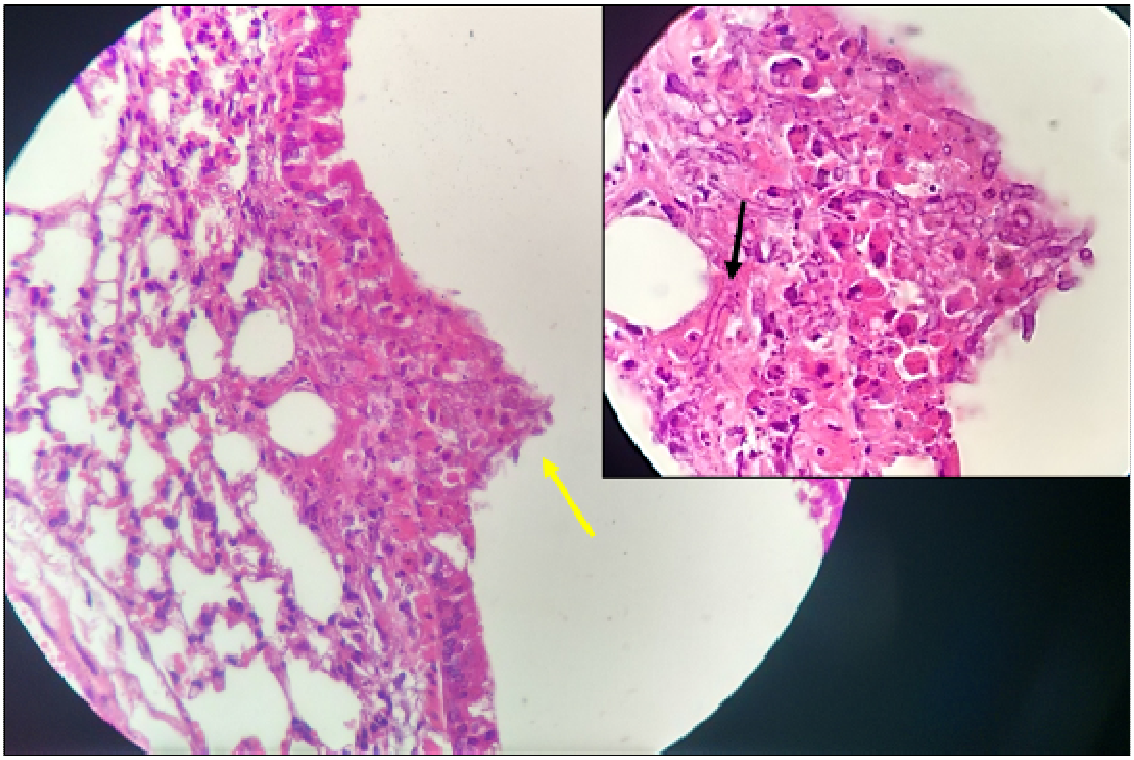
Figura 13 – Exame histopatológico de fragmentos de tecido pulmonar de camundongos após 48 horas (A) e 72 horas (B) de infecção, corado por hematoxilina eosina, demonstrando a presença de filamentos micelianos septados dicotômicos compatíveis para infecção fúngica (setas amarelas), além de intenso infiltrado neutrofílico (setas pretas) (400 x).



Foi possível observar intensa invasão ao lúmen dos bronquíolos, além da presença de hifas permeando os vasos sanguíneos (Figura 14). O tropismo por vasos sanguíneos é uma

característica marcante de *A. fumigatus* na infecção. Durante o desenvolvimento no tecido pulmonar, as hifas atravessam a barreira capilar alveolar e penetram nas células endoteliais, chegando ao lúmen das arteríolas pulmonares. As hifas induzem a própria internalização pelas células endoteliais, seguido pela injúria endotelial, o que culmina em trombose intravascular (KAMAI et al., 2006; 2009).

Figura 14 – Invasão do lúmem de bronquíolo de camundongo (seta amarela) infectado por *Aspergillus fumigatus,* evidenciado pelo exame histopatológico de fragmentos de tecido pulmonar, corado por hematoxilina eosina. No detalhe é possível a visualização de hifas permeando vasos sanguíneos (seta preta) (400 x).



4 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do presente estudo possibilitou a análise da produção de biofilme de isolados de *A. fumigatus* de diferentes origens, amostras ambientais e espécimes clínicos, e tempo de preservação. Adicionalmente, oportunizou o conhecimento da influência de um importante fator constitutivo do hospedeiro, a elastina, no biofilme de *A. fumigatus,* bem como seu efeito potencializador da produção de gliotoxina durante a formação desta estrutura. Ademais, permitiu a observação da diferente progressão da aspergilose pulmonar em animais infectados por isolados produtor e não produtor de gliotoxina.

A origem e tempo de preservação de isolados de *A. fumigatus* não influenciam a produção de biofilme, embora haja diferenças intraespecíficas. Ainda, a elastina promove aumento da quantidade de biofilme formado por *A. fumigatus,* avolumando a quantidade de matriz extracelular produzida e diminuindo sua hidrofobicidade. Além de estimular aumento na quantidade de gliotoxina produzida por este fungo durante o desenvolvimento do biofilme, evidenciada pela cromatografia líquida de alta eficiência. Sendo a progressão da aspergilose pulmonar muito mais severa em animais infectados por isolados produtores desta toxina, comprovado pela experimentação animal.

Assim, é possível concluir que fatores do hospedeiro, como a elastina, possuem influência na progressão da aspergilose pulmonar, carecendo de mais estudos afim de detalhar melhor o papel desta proteína na patogênese da doença, com o objetivo de fomentar conhecimento para o desenvolvimento de mecanismos capazes de inibir o estabelecimento ou progressão desta doença, dada a gravidade da aspergilose invasiva e aspergiloma.

REFERÊNCIAS

ABAD, A. et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successfulpathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 27, n. 4, p. 155–182, 2010.

ABARCA, M. L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, p. S79-S84, 2000.

AGARWAL, R. et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43, p. 850–873, 2013.

AGARWAL, R. et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: lessons from 126 patients attending a chest clinic in north India. **Chest**, v. 130, p. 442–448, 2006.

AHMAD, S.; AL-SHAIKH, A. A.; KHAN, Z. Development of a Novel Inhalational Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Rats and Comparative Evaluation of Three Biomarkers for Its Diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100524, 2014. Disponível em: < http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0100524>. Acesso em: 18 set 2015.

AIMANIANDA, V. et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. **Nature**, v. 460, p. 1117–1121, 2009.

AINSWORTH, G. C. **Introduction to the History of Mycology.** Cambridge: Cambridge University Press, 1976.

AL-ALAWI, A.; RYAN, C. F.; FLINT, J. D.; MÜLLER, N. L. *Aspergillus*-related lung disease. **Cancer Respiratory Journal**, v. 12, n. 7, p. 377-387, 2005.

ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 25, p. 201–225, 2011.

ALP, S.; ARIKAN, S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 331–337, 2008.

ALSHAREEF, F.; ROBSON, G. D. Genetic and virulence variation of the population of environmental and clinical isolates of the pathogenic *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**, v. 160, p. 742–751, 2014.

ALTES, A. et al. Frequent severe liver iron overload after stem cell transplatation and its possible association with invasive aspergillosis. **Bone Marrow Transplant**, v. 34, p. 505–509, 2004.

ARAUJO, R.; RODRIGUES, A. G. Variability of Germinative Potential among Pathogenic Species of *Aspergillus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4335–4337, 2004.

ARAUJO, R.; AMORIM, A.; GUSMÃO, L. Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor hospital environments. **Medical Mycology,** v. 48, p. 832-838, 2010.

ASKEW, D. S. *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. **Current Opinion in Microbiology,** v. 11, p. 331–337, 2008.

ASKEW, D. S.; KONTOYIANNIS, D. P.; CLEMONS, K. V. Advances Against Aspergillosis: Biology, Host response, Diagnosis and Treatment. **Mycopathologia,** v. 178, n. 5-6, p. 321-324, 2014.

BABAMAHMOODI, F. et al. Rare case of *Aspergillus ochraceus* osteomyelitis of calcaneus bone in a patient with diabetic foot ulcers. **Case Reports in Medicine**, v. 2015, Article ID 509827, 2015. Disponível em: < https://www.hindawi.com/journals/crim/2015/509827/cta/>. Acesso em 15 dez. 2016.

BALAJEE, S. A. et al. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5996-5999, 2005a.

BALAJEE, S. A. et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 3, p. 625-632, 2005b.

BALAJEE, S. A. et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 39-46, 2007a.

BALAJEE, S. A. et al. A nonsporulating clinical isolate identified as *Petromyces alliaceus* (anamorph *Aspergillus alliaceus*) by morphological and sequence based methods. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 45, p. 2701–2703, 2007b.

BALAJEE, S. A.; MARR, K. A. Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. **Future Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 435-445, 2006.

BALLOY, V. et al. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 494-503, 2005.

BANERJEE, B. et al. Immunological characterization of Asp f 2, a major allergen from *Aspergillus fumigatus* associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5175-5182, 1998.

BARNES, P. D., MARR, K. A. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p. 545-561, 2006.

BAYRY, J. et al. Hydrophobins—Unique Fungal Proteins. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002700, 2012. Disponível em: < http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002700>. Acesso em: 15 out. 2015.

BEAUVAIS, A. et al. Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in FLO1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 411-419, 2009.

BEAUVAIS, A. et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 1588-1600, 2007.

BEHNSEN, J. et al. Secreted *Aspergillus fumigatus* Protease Alp1 Degrades Human Complement Proteins C3, C4, and C5. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 8, p. 3585–3594, 2010.

BELCHER, J. R.; PLUMMER, N. S. Surgery in broncho-pulmonary aspergillosis. **British Journal of Diseases of the Chest**, v. 54, n. 4, p. 335-41, 1960.

BEN-AMI, R., et al. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. **Blood**, v. 114, p. 5393-5399, 2009.

BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. **British Journal of Haematology**, v. 150, p. 406–417, 2010.

BENNETT, J. H. 1842. XVII. On the Parasitic Vegetable Structures found growing in Living Animals. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**, v. 15, n. 2, p. 277-294. 1842. Disponível em: < https://books.google.com.br/books?id=NsMUAAAAYAAJ&pg=PA1&lpg=PA1&dq=On+the+parasitic+vegetable+structures+found+growing+in+living+animals&source=bl&ots=erQT1nb4Dy&sig=u1ktoR332f7rz8Mrn7kmvIBdiKk&hl=ptBR&sa=X&ved=0ahUKEwiks53cuK7cAhUHQZAKHXo6CnAQ6AEIOTAC#v=onepage&q=On%20the%20parasitic%20vegetable%20structures%20found%20growing%20in%20living%20animals&f=false> Acesso em: 12 abr. 2014.

BENNETT, J. W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. In: Machida, M.; Gomi, K. (Eds.) ***Aspergillus:*** **Molecular Biology and Genomics**. Norfolk: Caister Academic Press, 2010. Cap. 1, p. 1-18.

BENNETT, J. W., KLICH, M. Micotoxins. **Clinical microbiology Review**, v. 16, p. 497-516, 2003.

BERGMANN, A. et al. A regulator of *Aspergillus fumigatus* extracellular proteolytic activity is dispensable for virulence. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 4041-4050, 2009.

BIGERELLE, M. et al. An unscaled parameter to measure the order of surfaces: a new surface elaboration to increase cells adhesion. **Biomolecular Engineering**, v. 19, p. 79-83, 2002.

BITENCOURT, T. A. et al. Transcription profile of *Trichophyton rubrum* conidia grown on keratin reveals the induction of an adhesin-like protein gene with a tandem repeat pattern. **BMC Genomics**, v. 17, p. 249. 2016.

BOK, J. W. et al. LaeA, a regulator of orphogenetic fungal virulence factors. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p. 1574-1582, 2005.

BONNETT, C. R. et al. Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6528-6539, 2006.

BRANDÃO, I. S. L. **Análise comparativa entre métodos laboratoriais para diagnóstico da aspergilose pulmonary.** 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BRAZ, S. C. M. et al. Viabilidade, confirmação e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservardas sob óleo mineral na Coleção de Culturas University Recife Micology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 63-66, 2009.

BRUNS, S. et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. **PLoS Pathogens**, v. 6, p. 1000873, 2010a. Disponível em: < http://journals.plos.org/plosp athogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000873>. Acesso em: 13 mar. 2014.

BRUNS, S. et al. Functional genomic profiling of *Aspergillus fumigatus* biofilm reveals enhanced production of the mycotoxin gliotoxin. **Proteomics***,* v. 10, p. 3097-3107, 2010b.

BUGLI, F. et al. Increased production of gliotoxin is related to the formation of biofilm by *Aspergillus fumigatus*: an immunological approach. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 379-389, 2014.

CAMPS, S. M. et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates harboring the TR34/L98H azole resistance mechanism. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2674-2680, 2012.

CANNIZZO, F. T. et al. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v. 45, p. 357-361, 2007.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 354-358, 2000.

CERQUEIRA, L. B. et al. Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Early Diagnosis of Aspergillosis. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e92851, 2014. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3972208/>. Acesso em: 15 jan. 2015.

CHAI, L. Y. A. et al. *Aspergillus fumigatus* Conidial Melanin Modulates Host Cytokine Response**. Immunobiology**, v. 215, p. 915–920, 2010.

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

CHAUDHURI, R. et al. FungalRV: adhesin prediction and immunoinformatics portal for human fungal pathogens. **BMC Genomics**, v. 12, p. 192, 2011.

CHEN, Q-K.; JIANG, G-N.; DING, J-A. Surgical treatment for pulmonary aspergilloma: a 35-year experience in the Chinese population. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, v. 15, p. 77-80, 2012.

CHOTIRMALL, S. H.; MCELVANEY, N. G. Fungi in the cystic fibrosis lung: Bystanders or pathogens? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 52, p. 161-73, 2014.

CHOTIRMALL, S. H. et al. Immunoevasive *Aspergillus* virulence factors. **Mycopathologia**, v. 178, n. 5-6, p. 363-370, 2014.

CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. **Medical Mycology**, v. 43, n. S1, p. 101-110, 2005.

COMERA, C. et al. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 47-54, 2007.

CORNILLET A. et al. Comparison of epidemiological, clinical biological features of invasive aspergillosis in neutropenic nonneutropenic patients: a 6-year survey. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 577-584, 2006.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K-J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, p. 86-95, 1978.

CRAMER, R. A. et al. Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 6, p. 972-980, 2006.

CUSHION, M. T.; COLLINS, M. S.; LINKE, M. J. Biofilm formation by *Pneumocystis* spp. **Eukaryotic Cell**, v. 8, p. 197-206, 2009.

DAGENAIS, T. R. et al. *Aspergillus fumigatus* LaeA-mediated phagocytosis is associated with a decreased hydrophobin layer. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 823-829, 2010.

DAGENAIS, T. R. T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 447-465, 2009.

DAGUE, E. et al. Highresolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. **Biophysical Journal**, v. 94, p. 656-660, 2008.

D'ANTONIO, D. et al. Slime production by clinical isolates of *Blastoschizomyces capitatus* from patients with hematological malignancies and catheter-related fungemia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectios Diseases**, v. 23, p. 787-789, 2004.

DALY, R. C. et al. Pulmonary aspergilloma, results of surgical treatment. **The Journal of Thoracic an Cardiovascular Surgery**, v. 92, p. 981-988, 1986.

DASBACH, E. J., DAVIES, G. M., TEUTSCH, S. M. Burden of Aspergillosis Related Hospitalizations in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 1524-1528, 2000.

DE PAUW, B. et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. **Clinical Infectious Diseases,** v. 46, n. 12, p.1813-1821, 2008.

DENNING, D. W.; PLEUVRY, A.; COLE, D. C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. **Medical Mycology**, v. 51, p. 361-370, 2013.

DENNING, D. W. et al. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 3, p. S265-280, 2003.

DE VALK, H. A. et al. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1415-1419, 2007.

DOMINGO, M. P. et al. Bis (methyl)gliotoxin proves to be a more stable and reliable marker for invasive aspergillosis than gliotoxin and suitable for use in diagnosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 57-64, 2012.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, p. 881-890, 2002.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiology**, v. 11, p. 30-36, 2003.

DUARTE-ESCALANTE, E. et al. Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 427-433, 2009.

DUFRENE, Y. F. Direct characterization of the physicochemical properties of fungal spores using functionalized AFM probes. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 3286-3291, 2000.

DÜNNER, L. et al. Pneumoconiosis in grain workers, oil and flour millers. **British Journal of Tuberculosis and Diseases of the Chest**, v. 52, p. 291, 1958.

EL-SHANAWANY, A. A.; MOSTAFA, M. E.; BARAKAT, A. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic aspergilli toxins. **Mycopathologia**, v. 159, p. 281-289, 2005.

EPSTEIN, A. K. et al. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 108, p. 995-1000, 2011.

ERJAVEC, Z.; KLUIN-NELEMANS, H.; VERWEIJ, P. E. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 625-633, 2009.

FALLON, J. P.; REEVES, E. P.; KAVANAGH, K. The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1481-1488, 2011.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLOS Pathogen**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320593/pdf/ppat.1002585.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2013.

FARID, S. et al. Results of surgery for chronic pulmonary Aspergillosis, optimal antifungal therapy and proposed high risk factors for recurrence - a National Centre's experience. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 8, p. 180-188, 2013.

FAULKNER, S. L. et al. Hemoptysis and pulmonary aspergilloma: operative versus nonoperative treatment. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 25, p. 389-392, 1978.

FELDMESSER, M. Role of neutrophils in invasive aspergillosis. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6514–6516, 2006.

FERNÁNDEZ, L. K. et al. The different manifestations of pulmonary aspergillosis: Multidetector computed tomography findings. **Radiologia**, v. 56, n. 6, p. 496-504, 2014. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science /article/pii/S003383381300221X>. Acesso em: 16 de Agosto de 2014.

FILLER, S. G.; SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 12, p. e129, 2006. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov /pmc/articles/PMC1757199/. Acesso em: 02 abr. 2014.

FIORI, B. et al. In vitro activity of anidulafungin and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different *Candida* and *Aspergillus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 3031-3035, 2011.

FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Biosynthetic gene clusters for epipolythiodioxopiperazines in filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, p. 162-169, 2008.

FRISVAD, J. C. et al. Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. S53–71, 2009.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 45, p. 201-208, 2000.

GAMALETSOU, M. N. et al. *Aspergillus* Osteomyelitis: Epidemiology, Clinical Manifestations, Management, and Outcome. **Journal of Infection**, v. 68, n. 5, p. 478-493, 2014.

GAMS, W. et al. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: SAMSON, R. A., PITT, J. I. (Eds). **Advances in Penicillium and Aspergillus systematics.** vol 102. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), Boston: Springer 1986. Cap 1, p. 55–62

GARDINER, D. M.; HOWLETT, B. J. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, p. 241-248, 2005.

GARDINER, D. M.; WARING, P.; HOWLETT, B. J. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1021-1032, 2005.

GARVEY, G. S.; KELLER, N. P. Fungal secondary metabolites and their fundamental roles in human mycoses. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 256-265, 2010.

GEFTER, W. B. The spectrum of pulmonary aspergillosis. **Journal of Thoracic Imaging**, v. 7, p. 56-74, 1992.

GIBBONS, J. G. et al. Global Transcriptome Changes Underlying Colony Growth in the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 1, p. 68-78, 2011.

GIL, M. L. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infection and Immunity**, v. 64, p.5239-5247, 1996.

GOLDENBERG, S.; NICHOLAS, P. Opportunistic fungal lung infections. **Medicine**, v. 36, n. 6, p. 295-299, 2008.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, A. I. et al. Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 243, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5069814/pdf/12866_2016_Article_859.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2017.

GRAVELAT, F. N. et al. In vivo analysis of *Aspergillus fumigatus* developmental gene expression determined by real-time reverse transcription - PCR. **Infection and Immunology**, v. 76, p. 3632-3639, 2008.

GREENBERGER, P. A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, p. 685-692, 2002.

GREENBERGER, P. A. et al. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 2, n. 6, p. 703-708, 2014.

GUGNANI, H. C. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 346-357, 2003.

GUIMARÃES, L. C. et al. Methods to preserve potentially toxigenic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 43-47, 2014.

GUINEA, J. et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus*: an in-depth genotypic analysis of isolates involved in an outbreak of invasive aspergillosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3498-3503, 2011.

HAMMERMAN, K. J.; SAROSI, G. A.; TOSH, F. E. Amphotericin B in the treatment of saprophytic forms of pulmonary aspergillosis. **American Review of Respiratory Disease**, v. 109, p. 57-62, 1974.

HAZEN, K. C.; HAZEN, B. W. A polystyrene microsphere assay for detecting cell surface hydrophobicity within *Candida albicans* populations. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, p. 289-299, 1987.

HERSLETH, H .P. et al. Structures of the high-valent metal-ion haem-oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 460-476, 2006.

HEUKELEKIAN, H., HELLER, A. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. **Journal of Bacteriology**, v. 40, p. 547-558, 1940.

HILVERING, B. et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and other fungal diseases. **European Respiratory Monograph**, v. 52, p. 97-114, 2011.

HINSON, K. F. W.; MOON, A. J.; PLUMMER, N. S. Bronchopulmonary aspergillosis. A review and report of eight new cases. **Thorax**, v. 7, p. 317-33, 1952.

HOF, H.; KUPFAHL, C. Gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*: an example that mycotoxins are potential virulence factors. **Mycotoxin Research**, v. 25, p. 123-131, 2009.

HOHL, T. M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 11, p. 1953-1963, 2007.

HOLLAND, S. M.; VINH, D. C. Yeast infections: human genetics on the rise. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, p.1798-1801, 2009.

HOMEI, A.; WORBOYS, M. **Fungal Disease in Britain and the United States 1850–2000 Mycoses and Modernity**. Basingstoke: Palgrave Macmillan, UK. 2013; 225p.

HONG, S. B. et al. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 477-486, 2006a.

HONG, S. B. et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 6, n. 97, p. 1342-1355, 2006b.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 1-51, 2011.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P. DE; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 86, p. 199-249, 2014.

HUMMEL, M. et al. Detection of *Aspergillus* DNA by a nested PCR assay is able to improve the diagnosis of invasive aspergillosis in paediatric patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1291–1297, 2009.

HUNTER, D.; PERRY, K. M. A. Bronchiolitis resulting from the handling of bagasse. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 3, p. 64, 1946.

HUYAN, X-H. et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1293-1297, 2011.

INTERNATIONAL Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision Version for 2016. **World Health Organization**. 2016. Disponível em: < http://apps.who.int/ classifications/cd10/browse/2016/en#/B44 >. Acesso em 31 de agosto de 2016.

JAHN, B. et al. Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3736-3739, 2000.

JEWKES, J. et al. Pulmonary aspergilloma: analysis of prognosis in relation to haemoptysis and survey of treatment. **Thorax**, v. 38, p. 572-578, 1983.

KALOKHE, A. S. et al. *Aspergillus* endocarditis: a review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. e1040–e1047, 2010.

KAMAI, Y. et al. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with vascular endothelial cells. **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. S115-S117, 2006.

KAMAI, Y. et al. Polarized response of endothelial cells to invasion by *Aspergillus fumigatus*. **Cellular Microbiology**, v. 11, p. 170-182, 2009.

KAMEI, K.; WATANABE, A. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. **Medical Mycology**, v. 43, n. S1, p. 95-99. 2005.

KAUR, S.; SINGH, S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 52, p. 2-9, 2014.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-947, 2005.

KESH, S. et al. TLR1 and TLR6 polymorhisms are associated with susceptibility to invasive aspergilosis after allogeneic stem cell transplatation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1062, p. 95-103, 2005.

KHOUFACHE, K. et al. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 7, p.5-9, 2007.

KHOSRAVI, A. R. et al. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, p.167-172, 2012.

KLEIN, J. S.; FANG, K.; CHANG, M. C. Percutaneous transcatheter treatment of an intracavitary aspergilloma. **CardioVascular and Interventional Radiology**, v. 16, p. 321–324, 1993.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species.** 1rd Ed. Utrecht: Centraalbureau vöör Schimmelcultures. 2002.

KNUTSEN, A. P.; BELLONE, C.; KAUFFMAN, H. Immunopathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 1, p. 76-89, 2002.

KNUTSEN, A. P. et al. Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. **Clinical reviews in allergy and immunology**, v. 129, n. 2, p. 280-291, 2012.

KNUTSEN, A. P. et al. IL-4 alpha chain receptor (IL-4Rα) polymorphisms in allergic bronchopulmonary sspergillosis. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 4, p. 3-8, 2006.

KOCH, S.; HOHNE, F. M.; TIETZ, H. J. Incidence of systemic mycoses in autopsy material. **Mycoses**, v. 47, p. 40-46, 2004.

KONTOYIANNIS, D. P. Manipulation of host angioneogenesis: A critical link for understanding the pathogenesis of invasive mold infections? **Virulence**, v. 1, n. 3, p. 192-196, 2010.

KONTOYIANNIS, D. P. et al. Increased bone marrow iron stores is an independent risk factor for invasive aspergillosis in patients with high-risk hematologic malignancies and recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Cancer**, v. 110, n. 6, p. 1303-1306, 2007.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A. O. Pulmonary Aspergillosis: a clinical review. **European Respiratory Review**, v. 20, n. 121, p. 156-174, 2011.

KÖSE, S. et al. Central nervous system aspergillosis in an immunocompetent patient. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 4, p. 313-315, 2011.

KRAVITZ, J. N. et al. A Modern Series of Percutaneous Intracavitary Instillation of Amphotericin B for the Treatment of Severe Hemoptysis From Pulmonary Aspergilloma. **Chest**, v. 143, n. 5, p. 1414-1421, 2013.

KRISHNAN, S.; MANAVATHU, E. K.; CHANDRASEKAR, P. H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. **Mycoses**, v. 52, p. 206-222, 2009.

KUPFAHL, C.; GEGINAT, G.; HOF, H. Gliotoxin-mediated suppression of innate and adaptive immune functions directed against Listeria monocytogenes. **Medical Mycology**, v. 44, n. 7, p. 591-599, 2006.

KUPFAHL, C. et al. Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 319-327, 2008.

KWEON, Y. O. et al. Gliotoxin-mediated apoptosis of activated human hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 38-46, 2003.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? **Medical mycology**, v. 47, n. S1, p. S97-S103, 2009.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus*—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? **PLoS pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003743, 2013. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857757/>. Acesso em: 24 jan. 2014.

LACAZ, C. S. **Tratado de Micologia Médica**. 9 Ed. São Paulo: Sarvier. 2002.

LAI, C. et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 14, p. 77-85, 2008.

LAMARRE, C. et al. Galactofuranose attenuates cellular adhesion of *Aspergillus fumigatus*. **Cell Microbiology**, v. 11, p. 1612-1623, 2009.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 197-205, 2009.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus*, a saprotrophic pathogenic fungus. **Mycologist**, v. 17, n. 2, p. 56-61, 2003.

LEE, J. G. et al. Pulmonary aspergilloma: analysis of prognosis in relation to symptoms and treatment. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 138, p. 820-825, 2009.

LEE, K. S. et al. Treatment of hemoptysis in patients with cavitary aspergilloma of the lung: value of percutaneous instillation of amphotericin B. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 161, p. 727-731, 1993.

LEE, S. H. et al. Clinical manifestations and treatment outcomes of pulmonary aspergilloma. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 19, p, 38-42, 2004.

LEVDANSKY, E. et al. Coding tandem repeats generate diversity in *Aspergillus fumigatus* genes. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p. 1380-1391, 2007.

LEVITZ, S. M. Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1351-1355, 2004.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 999-1007, 2001.

LEWIS, R. E. et al. Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study. **Mycoses**, v. 56, p. 638-45, 2013

LEWIS, R. E. et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 635-637, 2005a.

LEWIS, R. E. et al. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6120-6122, 2005b.

LINDER, M. B. et al. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. **FEMS Microbiology Review**, v. 29, p. 877-896, 2005.

LIU, J. C.; MODHA, D. E.; GAILLARD, E. A. What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis? **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 12, p. 187-193, 2013.

LOPES, A. J. et al. Aspergiloses pulmonares. **Pulmão Rj**, v. 13, n. 1, p. 34-44, 2004.

LOPES-BEZERRA, L. M.; FILLER, S. G. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. **Blood**, v. 103, p. 2143-2149, 2004.

LOUSSERT, C. et al. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus.* **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 405-410, 2010.

MACARTNEY, J. N. Pulmonary aspergillosis: A review and description of three new cases. **Thorax**, v. 19, p. 287-297, 1964.

MACHADO, D. O. et al. Bilateral Aspergillus endophthalmitis in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. **British Journal of Ophthalmology***,* v. 87, n. 11, p. 1429-1430, 2003.

MAIYA, S. et al. The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus:* identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. **ChemBioChem: An European Journal of Chemical Biology**, v. 7, p. 1062-1069, 2006.

MARR, K. A. et al. Detection of Galactomannan Antigenemia by Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Variables That Affect Performance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, p. 641-649, 2004.

MARR, K. A. et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. **Blood**, v. 100, p. 4358-4366, 2002.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1021-1033, 2006.

MCCLENNY, N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. **Medical Mycology**, v. 43, p. S125-S128, 2005.

MCDONAGH, A. et al. Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000154, 2008. Disponível em: < https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2526178/ >. Acesso em: 14 mai. 2013

MENZEL, A. E. O.; WINTERSTEINER, O.; HOOGERHEIDE, J. C. The isolation of gliotoxin and fumigacin from culture filtrates of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 152, p. 419-429, 1944.

MICELI, M. H. et al. Iron overload is a major risk factor for severe infection after autologius stem cell transplatation: a study of 367 myeloma patients. **Bone Marrow Transplant**, v. 37, p. 857-864, 2006.

MICHELI, P. A. Nova Plantarum Genera justa Tournefortii Methodum Disposita. 1729. In: AINSWORTH, G.C. (Ed). **Introduction to the History of Mycology.** Cambridge: Cambridge University Press. 1976.

MILLER, M. A. et al. Visualization of murine intranasal dosing efficiency using luminescent Francisella tularensis: effect of instillation volume and form of anesthesia. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31359, 2012. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles /PMC3286442/ >. Acesso em: 15 dez. 2013

MIRALLES, L. M. **Investigating and exploiting fungal natural products in *Aspergillus* spp**. 2015. Tese (Doctor of Philosophy) – Maynooth University, National University of Ireland Maynooth. Irlanda. 359p

MOHAPATRA, B. et al. Surgical treatment of pulmonary aspergillosis: A single center experience. **Lung India**, v. 33, n. 1, p, 9-13, 2016.

MOMANY, M., TAYLOR, I. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. **Microbiology**, v. 146, n. 12, p. 3279-3284, 2000.

MOODLEY, L., PILLAY, J., DHEDA, K. Aspergilloma and the surgeon, **Journal of Thoracic Disease**, v. 6, n. 3, p. 202-209, 2014.

MORAES, H. M. S. O. **Quantificação de melanina e gliotoxina e diversidade genética de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus***. 2015. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MORGAN, J. et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. **Medical Mycology**, v. 43, n. 1, p. S49–S58, 2005.

MORRIS-JONES, R. et al. Synthesis of melanin-like pigment by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4026-4033, 2003.

MOWAT, E. et al. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1205-1212, 2007.

MOWAT, E. et al. Phase dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1281-1284, 2008a.

MOWAT, E. et al. The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. S120-S126, 2008b.

MUHAMMED, M. et al. Mouse models for the study of fungal pneumonia: A collection of detailed experimental protocols for the study of *Coccidioides, Cryptococcus, Fusarium, Histoplasma* and combined infection due to *Aspergillus-Rhizopus*. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 329-338, 2012.

MÜLLER, C. F.; SEIDLER, M.; BEAUVAIS, A. *Aspergillus fumigatus* biofilms in the clinical setting. **Medical Mycology**, v. 49, p. 96-100, 2011.

MUSZKIETA, L. et al. Investigation of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation by various "omics" approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-16, 2013.

NAGGIE, S.; PERFECT, J. R. Molds: Hyalohyphomycosis, Phaeohyphomycosis, and Zygomycosis. **Clinical Chest Medicine**, v. 30, p. 337-353, 2009.

NAKASONE, K. K.; PETERSON, S. W.; JONG, S. Preservation and distribution of Fungal cultures. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. M.; FOSTER, M. S. (Eds.). **Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods.** USA: Elsevier Inc., 2004. p. 37-47.

NETT, J. et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 510-520, 2007.

NICOLLE, M. C. et al. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. **Haematologica**, v. 96, n. 11, p.1685-1691, 2011.

NISHIDA, S. et al. Fungal metabolite gliotoxin targets flavocytochrome b558 in the activation of the human neutrophil NADPH oxidase. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 235-244, 2005.

NOBILE, C. J. et al. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. **PLoS Biology**, v. 7, n. 6, p. e1000133, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2688839/>. Acesso em: 14 jun. 2013.

NOSANCHUK, J. D. et al. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5124-5131, 2002.

O'GORMAN, C. M. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, p. 151-157, 2011.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 449-461, 1998.

OKUMURA, Y.; OGAWA, K.; NIKAI, T. Elastase and elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 5, p. 351-354, 2004.

PAN, X. Q.; HARDAY, J. Electromicroscopic observations on gliotoxin induced apoptosis of cancer cells in culture and human cancer xenografts in transplanted SCID mice. **In Vivo**, v. 21, p. 259-265, 2007.

PARIS, S. et al. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1581-1588, 2003.

PARULEKAR, A. D.; DIAMANT, Z.; HANANIA, N. A. Antifungals in severe asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 21, p. 48-54, 2015.

PASQUALOTTO, A. C. et al. The effects of antifungal therapy on severe asthma with fungal sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Respirology**, v. 14, p. 1121-1127, 2009.

PATRON, N. J. et al. Origin and distribution of epipolythiodioxopiperazine (ETP) gene clusters in filamentous ascomycetes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 174, 2007. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2045112/>. Acesso em: 13 mar. 2015.

PATTERSON, K. C.; STREK, M. E. Diagnosis and Treatment of Pulmonary Aspergillosis Syndromes. **Chest**, v. 146, n. 5, p. 1358-1368, 2014.

PATTERSON, T. F. The future of animal models of invasive aspergillosis. **Medical Mycology**, v. 43, n. S1, p. 115-119, 2005.

PAUL, B. C. et al. Quantifying the importance of galactofuranose in *Aspergillus nidulans* hyphal wall surface organization by atomic force microscopy. **Eukaryotic Cell**, v. 10, p. 646-653, 2011.

PEER, E. T. Case of Aspergillosis Treated with Amphotericin 'B'. **Ontario Laennec Society**, p. 222-230, 1958.

PEIXINHO, P. et al. Aspergilose pulmonar invasiva. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 97-99, 2003.

PENALVER, M. C. et al. Binding of human fibronectin to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1146-1153, 1996.

PENG, X. et al. Decrease in cell surface galactose residues of *Schizosaccharomyces pombe* enhances its coflocculation with *Pediococcus damnosus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3413-3417, 2001.

PERCIVAL, S. L. et al. Introduction to biofilms In: PERCIVAL, S. L., KNOTTENBELT, D. C., COCHRANE, C. A. (Eds.) **Biofilms and Veterinary Medicine**. Series: Springer Series on Biofilms. Berlim: Springer Science & Business Media, 2011.Vol. 6, XIV, 258 p.

PERKHOFER, S. et al. Human platelets attenuate *Aspergillus* species via granule-dependent mechanisms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p.1243-1246, 2008.

PHILIPPE, B. et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3034-3042, 2003.

PIHET, M. et al. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 177-188, 2009.

PIMENTEL, J. C. Pulmonary calcification in the tumor-like form of pulmonary aspergillosis: Pulmonary aspergilloma. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 94, p.208-216, 1966.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 67-70, 2007.

POLYPHASIC identification. **Schimmelcultures voor Centraalbureau**. CBS. 2011. Disponível em:<http://www.cbs.knaw.nl/aspergillus/BiolomicsID.aspx?IdentScenario=Asper gillus%20an d%20Penicillium%20Species%20ID>. Acesso em: 11 de agosto de 2014.

POPOFF, L.W. Ein fall von mycosis aspergillina nebst einigen Bemerkungen über aenliche Erkrankungen der Respirationjswege. Varsovie; v. 3, p. 316-317, 1887.

RAFFERTY, P. et al. What happens to patients with pulmonary aspergilloma? Analysis of 23 cases. **Thorax**, v. 38, p. 579-583, 1983.

RAJENDRAN, R. **Adaptive Resistance Mechanisms of *Aspergillus fumigatus* Biofilms**. 2013. Tese (Degree of Doctor of Philosophy School of Medicine College of Medical, Veterinary and Life Sciences). University of Glasgow. Reino Unido. 267p.

RAJENDRAN, R. et al. Azole resistence of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. **Antimicrobial agents chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2092-2097, 2011.

RAJENDRAN, R. et al. Extracellular DNA Release Acts as an Antifungal Resistance Mechanism in Mature *Aspergillus fumigatus* Biofilms. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 3, p. 420-429, 2013.

RAMAGE, G. et al. Our current understanding of fungal biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p. 340-355, 2009.

RAMAGE, G. et al. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. **FEMS Microbiolofy Letters**, v. 324, p. 89-97, 2011a.

RAMAGE, G. et al. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, Article ID 528521, 14 p, 2011b. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pmc/articles/PMC3299327/pdf/IJMB2012-528521.pdf. Acesso em: 14 jan. 2013.

RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 163-170, 2001.

RAMANA, J.; GUPTA, D. FaaPred: a SVM-based prediction method for fungal adhesins and adhesin-like proteins. **PLoS ONE**, v. 5, p. e9695. 2010. Disponível em: <

http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0009695>. Acesso em: 13 dez. 2013.

RANKIN, N. E. Disseminated Aspergillosis and Moniliasis Associated with Agranulocytosis and Antibiotic Therapy. **British Medical Journal**, v. 1, p. 918-919, 1953.

RAPAKA, R. R.; KOLLS, J. K. Pathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: current understanding and future directions. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. S331–S337, 2009.

RAPPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The genus Aspergillus**, 3rd edition. Florida: Publishing Company Malabar, 1977.

REMENTERIA, A. et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, p. 1-23, 2005.

RÉNON, L. Recherches cliniques et Experimentales sur la Pseudo-Tuberculose Aspergillaire. These de Paris, 1893, No. 89. In: **Etude sur L'Aspergillose chez les Animaux et chezl'Homme**. Paris: Masson, 1897.

RODRIGUEZ, P. L.; CARRASCO, L. Gliotoxin: inhibitor of poliovirus RNA synthesis that blocks the viral RNA polymerase 3Dpol. **Journal of Virology**, v. 66, p. 1971–1976, 1992.

ROILIDES, E. et al. Elevated Serum Concentrations of Interleukin-10 in Nonneutropenic Patients with Invasive Aspergillosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 518-520, 2001.

ROMERO-MARTINEZ, R. et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3696-3703, 2000.

ROSAS, A. L. et al. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. **Infection Immunity**, v. 68, p. 2845-2853, 2000a.

ROSAS, A. L. et al. Isolation and serological analyses of fungal melanins. **The Journal of Immunological Methods**, v. 244, p. 69-80, 2000b.

RUIZ JÚNIOR, R. L. et al. Surgical treatment of pulmonary aspergilloma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 6, p. 779-783, 2010.

SALES, M. P. U. Aspergillosis: from diagnosis to treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1238-1244, 2009.

SALES-CAMPOS, H. et al. The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. **BioMed research international**. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745895/pdf/BMRI2013-693023.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2015.

SANTOS, V. M.; DORNER, J. W.; CARREIRA, F. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. **Mycopathologia**, v. 156, n. 2, p. 133-138, 2003.

SAMSON, R. A. et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 147-203, 2007a.

SAMSON, R. A. et al. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 129-145, 2007b.

SAMSON, R. A. et al. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 71-73, 2007c.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SARFATI, J. et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 55, p. 279-291, 2006.

SCHARF, D. H. et al. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 467-472, 2012.

SCHIMIDT, A.; SCHIMIDT, D. I. J. B. Georg W. Fresenius and the description of the species *Aspergillus fumigatus* in 1863. In: BRAKHAGE, A. A.; JAHN, B.; SCHIMIDT, A. (Eds). ***Aspergillus fumigatus*: Biology, Clinical Aspects and Molecular Approaches to Pathogenicity.** Basel: Karger, 1999, vol 2, p. 1-4.

SCHIMMELPFENNIG, C. et al. Skin involvement as the first manifestation of systemic aspergillosis in patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 27, p. 753-755, 2001.

SCHLAM, D. et al. Gliotoxin Suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Homeostasis. **mBio***,* v. 7, n. 2, p. e02242- e02215, 2016.

SCHMALHORST, P. S. et al. Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, p. 1268-1277, 2008.

SCHOLTMEIJER, K.; WESSELS, J. G. H.; WOSTER, H. A. B. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p. 1-8, 2001.

SCHRETTL, M. et al. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 1213-1219, 2004.

SCHRETTL, M. et al. The crucial role of the *Aspergillus fumigatus* siderophore system in interaction with alveolar macrophages. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 1035-1041, 2010.

SCHUMANN, U. et al. RNA silencing in fungi. **Frontiers in Biology**, p. 5, n. 6, p. 478-494, 2010.

SEIDLER, J. M.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F. M. 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.

SEO, K. W. et al. Protective role of Interleukin-10 promoter gene polymorphism in the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis after allogeneic stem cell tranplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 36, p. 1089-1095, 2005.

SHARON, H.; HAGAG, S.; OSHEROV, N. Transcription factor PrtT controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 4051-4060, 2009.

SHEPPARD, D. C. Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 375-379, 2011.

SHEPPARD, D. C. et al. Novel Inhalational Murine Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1908-1911, 2004a.

SHEPPARD, D. C. et al. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 30480-30489, 2004b.

SHERIDAN, K. J.; DOLAN, S. K.; DOYLE, S. Endogenous cross-talk of fungal metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-11, 2015.

SHERIF, R.; SEGAL, B. H. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16, p. 242-250, 2010.

SHIBUYA, K. et al. Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, p. 138-145, 2004.

SHOPENHAUER, A. **Sobre a filosofia e seu método.** 1 Ed. São Paulo: Hedra, 2010.

SHOPOVA, I. et al. Extrinsic extracellular DNA leads to biofilm formation and colocalizes with matrix polysaccharides in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-11, 2013.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, p. 681-689, 2009.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiololgy Review**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SINGH, R.; SHIVAPRAKASH, M. R.; CHAKRABARTI, A. Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. **Microbiology**, v. 157, n. 9, p. 2611-2618, 2011.

SINGHAL, D. et al. *Aspergillus fumigatus* biofilm on primary human sinonasal epithelial culture. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 25, n. 4, p. 219-225, 2011.

SIQUEIRA, V.; LIMA, N. Surface hydrophobicity of culture and water biofilm of *Penicillium* spp. **Current Microbiology**, v. 64, p. 93-99, 2012.

SLUYTER, F. T. De Vegetabilibus Organisme Animalis Parasitis. *Diss mnaug Berlin*. 1847. In: PEER, E. T. Case of Aspergillosis Treated with Amphotericin 'B'. **Ontario Laennec Society**, p. 222-230, 1958.

SMITH, K. et al. *Aspergillus fumigatus* enhances elastase production in *Pseudomonas aeruginosa* co-cultures. **Medical Mycology**, v. 53, n. 7, p. 645-655, 2015.

SOUBANI, A. O.; CHANDRASEKAR, P. H. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Chest**, v. 121, n. 6, p. 1988-1999, 2002.

SOUZA, C. A. **Aspergilose e candidíase pulmonar em pacientes imunocomprometidos: estudo comparativo dos achados de tomografia computadorizada de alta resolução**. 2006. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina-UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SPETH, C. et al. Gliotoxin as putative virulence factor and immunotherapeutic target in a cell culture model of cerebral aspergillosis. **Molecular immunology**, v. 48, n. 15-16, p. 2122-2129, 2011.

STANZANI, M. et al. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. **Blood**, v. 105, p. 2258-2265, 2005.

STEPHENS-ROMERO, S. D.; MEDNICK, A. J.; FELDMESSER, M. The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 114-125, 2005.

STEVENS, D. A. et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis—state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 3, p. S225-264, 2003.

STEVENS, D. A. et al. Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 696-709, 2000.

SUGUI, J. A. et al. Genes differentially expressed in conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon exposure to human neutrophils. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2655, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18648542>. Acesso em: 12 fev. 2015.

SUGUI, J. A. et al. Role of *laeA* in the regulation of *alb1*, *gliP*, conidial morphology, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v.6, n. 9, p. 1552–1561, 2007a.

SUGUI, J. A. et al. Gliotoxin is a Virulence Factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP Deletion Attenuates Virulence in Mice Immunosuppressed with Hydrocortisone. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 9, p. 1562-1569, 2007b.

TABORDA, C. P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, p. 331-339, 2008.

TACCOME F. S. et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. **Critical Care**, v. 19, p. 7-21, 2015.

TAHIR C. et al. Primary cutaneous aspergillosis in an immunocompetent patient. **Journal of Surgical Technique and Case Report**, v. 3, p.94-96, 2011.

TAMGADGE, A. P. et al. Chronic invasive aspergillosis of paranasal sinuses: A case report with review of literature. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology***,* v. 16, n. 3, p. 460-464, 2012.

TOMEE, J. F. et al. Serologic monitoring of disease and treatment in a patient with pulmonary aspergilloma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, p. 199-204, 1995.

TORRELO, A. et al. Primary Cutaneous Aspergillosis in a Leukemic Child. **Actas Dermo-sifiliográficas**, v. 98, p. 276-278, 2007.

TOYOTOME, T. et al. Fetuin A, a serum component, promotes growth and biofilm formation by *Aspergillus fumigatus.* **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, p. 108-116, 2012.

TRONCHIN, G. et al. Expression and identification of a lamininbinding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 9-15, 1997.

TSUNAWAKI, S. et al. Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3373-3382, 2004.

UDAGAWA, S.; UCHIYAMA, S. *Neocarpenteles*: a new ascomycete genus to accommodate *Hemicarpenteles acanthosporus*. **Mycoscience**, v. 43, p. 3-6, 2002.

UNIS, G.; PICON, P. D.; SEVERO, L. C. Coexistence of intracavitary fungal colonization (fungus ball) and active tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 2, p. 139-143, 2005.

UPADHYAY, S. K. et al. Identification and characterization of a lamininbinding protein of *Aspergillus fumigatus*: extracellular thaumatin domain protein (AfCalAp). **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 714-722, 2009.

VALDIVIA, R. H.; HEITMAN, J. Endosymbiosis: the evil within. **Current Biology**, v. 17, p. 408-410, 2007.

VALLOR, A. C. et al. Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2593-2598, 2008.

VILLENA, C. K.; GUTIERREZ-CORREA, M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. **Letter in Applied Microbiology**, v. 45, p. 231-237, 2007.

VIRCHOW, R. Beitrage zur Lehre von den beim Menschen vorkommenden pflanzlichen Parasiten. **Virchow's Archives Pathology and Anatomy**, v. 9, p. 557, 1856. In: PEER, E. T. Case of Aspergillosis Treated with Amphotericin 'B'. **Ontario Laennec Society**, p. 222-230, 1958.

WAHL, E. F.; ERICKSON, M. J. Primary pulmonary aspergillosis. **Journal of the Medical Association of Georgia**, **v.** 17, p.341, 1928.

WALICKA-SERZYSKO, K.; SANDS, D. The clinical presentations of pulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis - preliminary report. **Developmental Period Medicine**, v. 19, n. 1, p. 66-79, 2015.

WALSH, T. J. et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 3, p. 327-60, 2008.

WATANABE, A. et al. *Aspergillus fumigatus alb1* encodes naphthopyrone synthase when expressed in *Aspergillus oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 192, p. 39-44, 2000.

WIEMANN, P. et al. Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 42, p. 17065-17070, 2013.

WÖSTEN, H. A. B. Hydrophobins: multipurpose proteins. **Annual Review in Microbiology**, v. 55, p. 625-646, 2001.

WRIGHT, J. R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 58-68, 2005.

YAMADA, H. et al. Topical treatment of pulmonary aspergilloma by antifungals. **Chest**, v. 103, p. 1421-1425, 1993.

YOUNGCHIM, S.; HAY, R. J.; HAMILTON, A. J. Melanization of *Penicillium marneffei in vitro* and *in vivo*. **Microbiology**, v. 151, p. 291-299, 2005.

YOUNGCHIM, S. et al. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus.* **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 175-181, 2004.

YU, J. et al. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, p. 194-202, 2005.

ZAAS, A. et al. Plasminogen alleles influence susceptibility to invasive aspergillosis. **PLoS Genetics**, v. 4, p. e1000101, 2008. Disponível em: < http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000101>. Acesso em: 10 dez. 2014.

ZAREMBER, K. A. et al. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. **Journal of Immunology**, v. 178, p. 6367-6373, 2007.

ZHAO, Y. et al. Detection of *Aspergillus fumigatus* in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1378-1383, 2010.

ZMEILI, O. S.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 100, n. 6, p. 317-334, 2007.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO NA BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

http://www.bjmicrobiol.com.br/

Bacterial and Fungal Pathogenesis

Elastin increases biofilm and extracellular matrix production of *Aspergillus fumigatus*

Ildnay de Souza Lima Brandão[a], *Heloiza Maria da Silva Oliveira-Moraes*[b], *Cristina Maria de Souza Motta*[c], *Neiva Tinti de Oliveira*[c], *Oliane Maria Correia Magalhães*[a,*]

[a] Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Cidade Universitária, PE, Brazil
[b] Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas Rua Departamento de Micologia, Cidade Universitária, PE, Brazil
[c] Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Pernambuco, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 October 2016
Accepted 2 October 2017
Available online 13 February 2018

Associate Editor: Waldir Elias

Keywords:
Aspergillus fumigatus
Biofilm
Elastin
Extracellular matrix
Hydrophobicity

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is an opportunistic saprobe fungus that accounts for 90% of cases of pulmonary aspergillosis in immunosuppressed patients and is known for its angiotropism. When it reaches the respiratory tract, *A. fumigatus* interacts with structural components and blood vessels of the lungs, such as elastin. To understand the effect of this structural component, we examined the effect of elastin on the production and development of the biofilm of *A. fumigatus*. In RPMI containing 10 mg/mL of elastin, a significant increase (absorbance $p < 0.0001$; dry weight $p < 0.0001$) in the production of biofilm was observed in comparison to when RPMI was used alone, reaching a maximum growth of 18.8 mg (dry weight) of biofilm in 72 h. In addition, elastin stimulates the production ($p = 0.0042$) of extracellular matrix (ECM) and decreases ($p = 0.005$) the hydrophobicity during the development of the biofilm. These results suggest that elastin plays an important role in the growth of *A. fumigatus* and that it participates in the formation of thick biofilm.

© 2018 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Introduction

Aspergillus fumigatus is an opportunistic saprobe fungus that accounts for 90% of pulmonary aspergillosis cases in immunosuppressed patients. This disease can exhibit various clinical forms, mainly consisting of allergic bronchopulmonary aspergillosis, aspergilloma, and invasive aspergillosis (IA), which are important causes of morbidity and mortality ranging from 70 to 90%.[1,2]

In aspergilloma and IA, *A. fumigatus* behaves as a multicellular community surrounded by an extracellular matrix (ECM), which is characteristic of a biofilm[3,4] and may explain, together with histological evidence, the resistance to antifungal agents when these clinical forms are treated.[5,6]

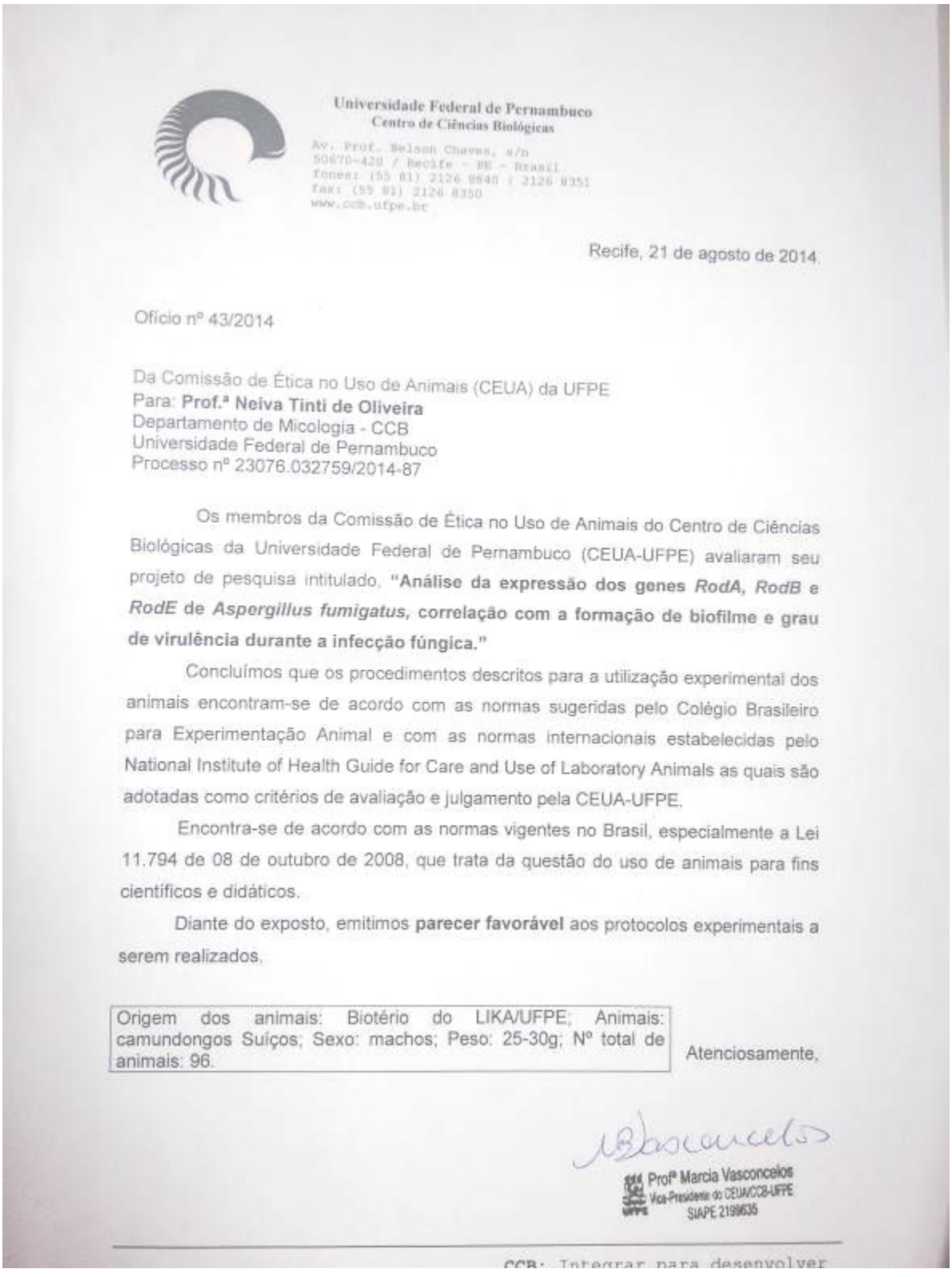
The development of this fungus within the lungs and the angiotropism[7,8] allow this microorganism to be in direct contact with elastin, one of the main structural components of the

* Corresponding author.
E-mail: olimicomed@yahoo.com.br (O.M. Magalhães).

https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.10.004

1517-8382/© 2018 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8340 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 21 de agosto de 2014.

Ofício nº 43/2014

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Neiva Tinti de Oliveira**
Departamento de Micologia - CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.032759/2014-87

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Análise da expressão dos genes *RodA*, *RodB* e *RodE* de *Aspergillus fumigatus*, correlação com a formação de biofilme e grau de virulência durante a infecção fúngica."**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

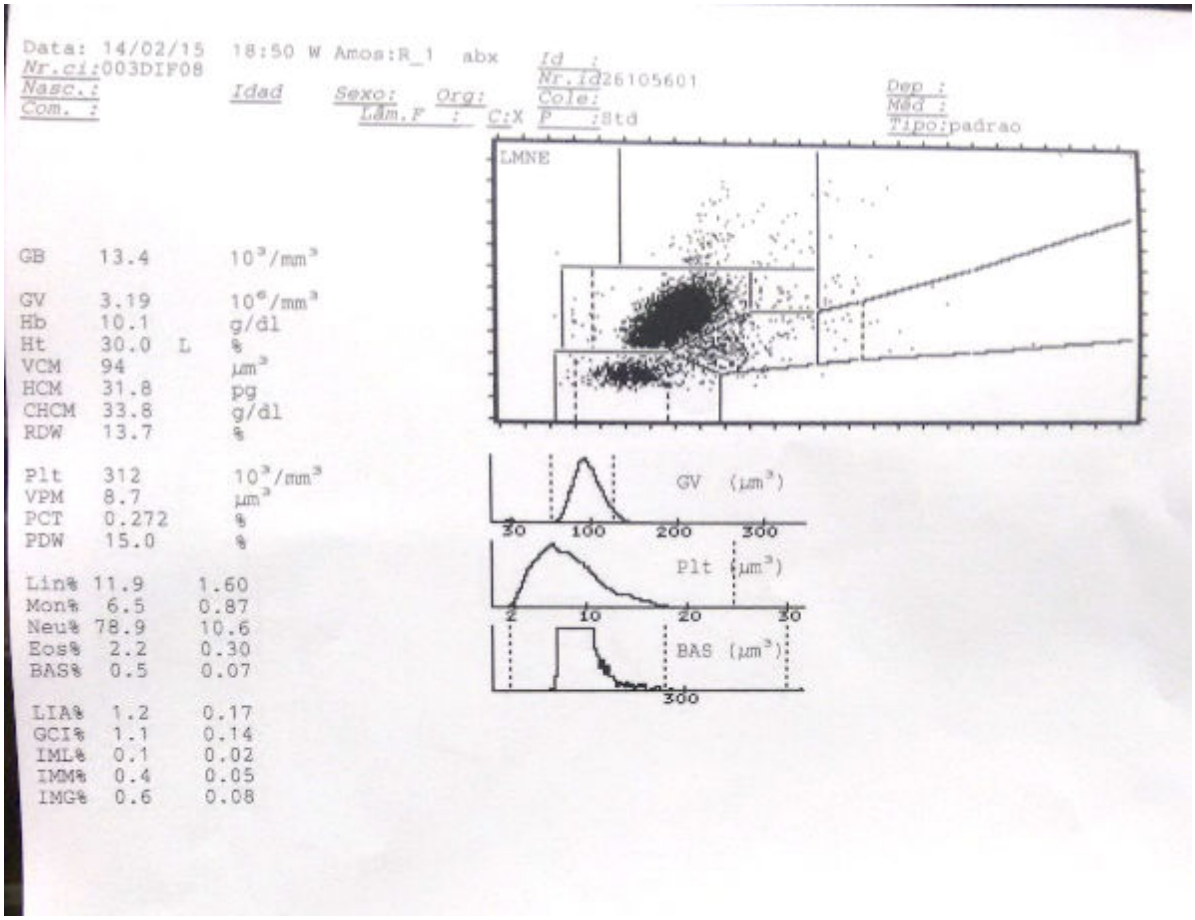
Origem dos animais: Biotério do LIKA/UFPE; Animais: camundongos Suíços; Sexo: machos; Peso: 25-30g; Nº total de animais: 96.

Atenciosamente,

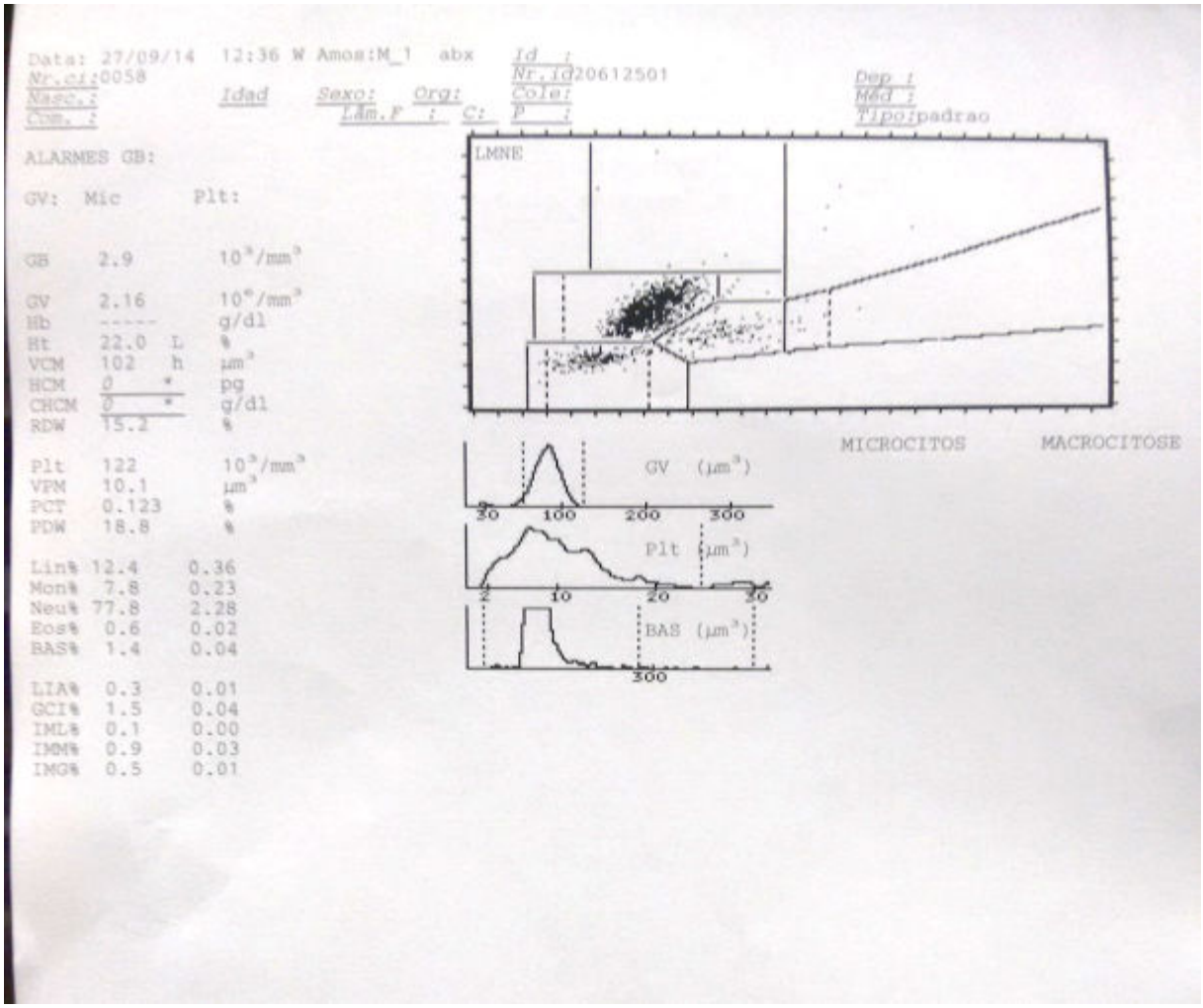
Profª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO C – HEMOGRAMA DE CAMUNDONGO SAUDÁVEL NÃO IMUNOSSUPRIMIDO



ANEXO D – HEMOGRAMA DE CAMUNDONGO SAUDÁVEL IMUNOSSUPRIMIDO



Data: 27/09/14 12:36 W Amos:M_1 abx
Nr.ci:0058
Nome:
Com.:
Idad
Sexo:
Org:
Lam.F :
C:
Id :
Nr.Id:20612501
Cole:
P :
Dep :
Méd :
Tipo:padrao

ALARMES GB:

GV: Mic Plt:

GB	2.9		$10^3/mm^3$
GV	2.16		$10^6/mm^3$
Hb	-----		g/dl
Ht	22.0	L	%
VCM	102	h	μm^3
HCM	0	*	pg
CHCM	0	*	g/dl
RDW	15.2		%
Plt	122		$10^3/mm^3$
VPM	10.1		μm^3
PCT	0.123		%
PDW	18.8		%

Lin%	12.4	0.36
Mon%	7.8	0.23
Neu%	77.8	2.28
Eos%	0.6	0.02
BAS%	1.4	0.04
LIA%	0.3	0.01
GCI%	1.5	0.04
IML%	0.1	0.00
IMM%	0.9	0.03
IMG%	0.5	0.01