



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**QUANTIFICAÇÃO DE MELANINA E GLIOTOXINA E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *ASPERGILLUS***

HELOIZA MARIA DA SILVA OLIVEIRA MORAES

RECIFE

ABRIL/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**QUANTIFICAÇÃO DE MELANINA E GLIOTOXINA E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *ASPERGILLUS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada
Nome do aluno: Heloiza Maria da Silva Oliveira Moraes

Orientador: Neiva Tinti de Oliveira

Co-orientador: Oliane Maria Correia Magalhães

RECIFE

ABRIL/2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Moraes, Heloiza Maria da Silva Oliveira

Quantificação de melanina e gliotoxina e diversidade genética de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* / Heloiza Maria da Silva Oliveira Moraes - Recife: O Autor, 2015.

107 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Coorientadora: Oliane Maria Correia Magalhães

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2015.

Inclui referências e anexos

1. *Aspergillus* 2. Melaninas 3. Genética I. Oliveira, Neiva Tinti de (orient.) II. Magalhães, Oliane Maria Correia (coorient.) III. Título

579.5657

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 434

**QUANTIFICAÇÃO DE MELANINA E GLIOTOXINA E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *ASPERGILLUS***

HELOIZA MARIA DA SILVA OLIVEIRA MORAES

Data da defesa: 30/04/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Neiva Tinti de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Guilherme Maranhão Chaves – Examinador Externo

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dra. Mariele Porto Carneiro Leão – Examinador Externo

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Rejane Pereira Neves – Examinador Interno

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Isvania Maria Serafim da Silva Lopes – Examinador Externo

Universidade Federal de Pernambuco

Ensinarás a voar...
Mas não voarão o teu voo.
Ensinarás a sonhar...
Mas não sonharão o teu sonho.
Ensinarás a viver...
Mas não viverão a tua vida.
Ensinarás a cantar...
Mas não cantarão a tua canção.
Ensinarás a pensar...
Mas não pensarão como tu.
Porém, saberás que cada vez que voem,
sonhem, vivam, cantem e pensem...
Estará a semente do caminho ensinado e
aprendido!

Madre Teresa de Calcutá

Agradecimentos

A Deus, Senhor de todas as coisas, princípio e fim, a Ele rendo glórias por mais esta conquista!

A Universidade Federal de Pernambuco, e ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, pela oportunidade, em especial a secretária Anna Karolina.

Ao Departamento de Micologia, pela utilização de suas dependências e equipamentos.

As minhas orientadoras Neiva Tinti e Oliane Magalhães pela disponibilidade, ensinamentos e paciência.

Aos professores Armando Marsden, Rejane Neves, Patricia Tiago e Bruno Severo pela amizade, conselhos, momentos de descontração e palavras de carinho.

Aos professores do Departamento de Micologia, por deixarem seus laboratórios à disposição para realização desta pesquisa.

A equipe da Micoteca URM, nas pessoas da profa. Cristina Motta, Maria José e da técnica Eliane Barbosa, pelo fornecimento das culturas e disponibilidade.

A profa. Tânia Sarmento e a Girliane Regina, do Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica da UFRPE, pela disponibilidade e auxílio na realização da CLAE.

A Elaine Silva e Elias Silva, técnicos da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF-UFPE) pela gentileza na realização da MEV e espectrofotometria de infravermelho.

As professoras Teresa Jansem e Isvania Serafim, que gentilmente cederam seu laboratório no Departamento de Biofísica (UFPE), para realização do experimento animal.

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

A técnica Silvania Paz do Departamento de Patologia (UFPE) pelo auxílio no processamento do material e confecção das lâminas do histopatológico.

.

Ao meu esposo Renato Moraes, por seu amor, sua confiança, por ser minha rocha, meu exemplo de profissional e de ser humano, por ter abdicado da minha presença em tantos momentos, e pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho, muito obrigada! Te amo!

A minha mãe, Lindalva, pela educação e exemplos que me deu, por me ensinar o caminho do bem. Se consegui chegar até aqui, foi porquê você segurou minha mão, me levou para o meu primeiro dia de aula na vida, cuidou de mim e cuida até hoje. Amo você!

A toda minha família e a família do meu esposo, que agora é minha também, pelo amor, incentivo e torcida sempre.

A Ildnay Brandão, por sua amizade, por ter sido minha companheira de trabalho e de tantas vivências, pela ajuda fundamental, disponibilidade, paciência e momentos de descontração, muito obrigada!

A Joobson Camelo, pela amizade e auxílio em vários momentos.

A Tatianne Leite, irmã de coração, por sua amizade e carinho, que muito me ajudou e me incentivou nesta caminhada.

A Alexsandra Silva, Paula Vieira, Susane Chang, pela amizade, disponibilidade e por sempre trazer uma palavra de carinho e incentivo.

Aos amigos Julliana Ribeiro, Rodrigo Holanda e Alide Fontes, que mesmo a distância estão sempre presentes na minha vida e no meu coração.

Aos amigos da pós graduação e do Laboratório de Imunodiagnóstico de Micoses Sistêmicas e Micologia Médica: Daniela Buonafina, Michellângelo, Pamella, Ana Emilia, Fabiola, Elvis, Caroline Sanuzi, Odacy, Franz, Cícero, Aline Julião, Marilia Gomes, Melyna, Nadja, Nelson, Suanni, Silvio e Ana Paula, pelos momentos de descontração e terapias do riso e pelos momentos de desabafo.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Espécies de *Aspergillus* são sapróbias presentes no solo ou matéria vegetal em decomposição e dependendo do estado imunológico do hospedeiro, podem causar infecções fúngicas oportunistas, como aspergilose invasiva. Os objetivos deste trabalho foram analisar a variabilidade genética, quantificar melanina e gliotoxina em 57 isolados de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* de origens ambiental e clínica e estabelecer um modelo experimental de aspergilose pulmonar. Através do uso de marcadores moleculares ISSR, foi avaliada a variabilidade genética entre os isolados. Os isolados de *A. flavus*, com o uso dos marcadores (GACA)₄ e (GTG)₅, apresentaram agrupamentos em função da origem. O marcador (GTG)₅ foi o que melhor separou os isolados em função da origem clínica ou ambiental, enquanto o marcador (GACA)₄ foi o que mostrou melhor a variabilidade genética entre os isolados. Os conídios de todos os isolados produziram partículas de melanina, a partir de uma sequência de tratamentos com enzimas, agentes desnaturantes e ácido concentrado em alta temperatura, não havendo diferença estatística em função da espécie e do substrato. A análise dos espectros de infravermelho do pigmento produzido por cada isolado mostrou diferenças entre os perfis de melanina. As partículas escuras foram visualizadas em microscopia óptica e eletrônica de varredura. Oito isolados de *A. fumigatus* produziram gliotoxina nas condições de cultivo e análise estabelecidas, sendo quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência, e as concentrações mínima e máxima de 0,039mg/ml e 0,150mg/ml, respectivamente, com destaque para o isolado URM3812. Houve diferença estatística na quantidade de gliotoxina entre isolados da mesma espécie e o substrato de origem. Os isolados de *A. flavus* e *A. niger* não produziram gliotoxina nas condições estabelecidas. O modelo experimental foi estabelecido com sucesso utilizando os isolados URM3812, produtor de gliotoxina de origem ambiental e URM6753, não produtor de origem clínica, no qual ambos os isolados foram capazes de reproduzir a doença, não havendo diferenças no dano tecidual.

Palavras-chave: Aspergilose, diversidade genética, ISSR, (GACA)₄, (GTG)₅, melanina, gliotoxina, modelo experimental.

ABSTRACT

Aspergillus species are saprophytic present in soil or rotten vegetal material, and depending on the immune status of the host can cause opportunistic fungal infections such as invasive aspergillosis. The objectives of this study were to analyze the genetic variability, quantify melanin and gliotoxin in 57 isolates of *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. niger* environmental and clinical sources and establish an experimental model of pulmonary aspergillosis. The use of molecular markers ISSR evaluated the genetic variability among isolates. The isolates of *A. flavus*, with the use of the markers (GACA)₄ and (GTG)₅ showed groups according to the origin. The marker (GTG)₅ was the best separated the isolates to the clinical or environmental origin, the marker (GACA)₄ was the best showed the genetic variability among isolates. Conidia of all isolates produced melanin particles, from a sequence of treatments with enzymes, denaturing agents and concentrated acid at high temperature, with no statistical difference depending on the species and the substrate. Analysis of the infrared spectra of the pigment produced by each isolate showed differences in melanin profiles. The dark particles were visualized in light microscopy and scanning electron microscopy. Eight isolates of *A. fumigatus* produced gliotoxin in growing conditions and analysis determined, and quantified by high performance liquid chromatography, and minimum and maximum concentrations of 0,039mg/ml and 0,150mg/ml, respectively, standing out the isolated URM3812. There was a statistical difference in the amount of gliotoxin among isolates of the same species and the substrate of origin. The isolates of *A. flavus* and *A. niger* produced no gliotoxin the established conditions. The experimental model was successfully established using isolated URM3812, gliotoxin producer of environmental origin and URM6753, not producer of clinical origin, in which the isolates were able to reproduce the disease, with no differences in tissue damage.

Key-words: Aspergillosis, Genetic Diversity, ISSR, (GACA)₄, (GTG)₅, melanin, gliotoxin, experimental model.

Lista de figuras

	Pag.
Figura 1. Camundongos Swiss (<i>mus musculus</i>) em gaiola (A e B).	56
Figura 2. Perfis de amplificação de ISSR de <i>A. fumigatus</i> obtidos com o marcador (GACA) ₄ . Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 1-10, 21 e 22: isolados ambientais, pistas 11-20 e 23: isolados clínicos.	58
Figura 3. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GACA) ₄ , de isolados de <i>A. fumigatus</i> . Números 1-10, 21 e 22: isolados ambientais, números 11-20 e 23: isolados clínicos.	59
Figura 4. Perfis de amplificação de ISSR obtidos de <i>A. flavus</i> com o marcador (GACA) ₄ . Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 24, 29-36: isolados clínicos, pistas 25-28, 37-39: isolados ambientais.	59
Figura 5. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GACA) ₄ , obtidos de isolados de <i>A. flavus</i> . Números 24, 29-36: isolados clínicos, números 25-28, 37-39: isolados ambientais.	60
Figura 6. Perfis de amplificação de ISSR obtidos de <i>A. niger</i> com o marcador (GACA) ₄ . Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 40, 46-53: isolados clínicos, pistas 41-45, 54-57: isolados ambientais.	60
Figura 7. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GACA) ₄ , obtidos de isolados de <i>A. niger</i> . Números 40, 46-53: isolados clínicos, números 41-45, 54-57: isolados ambientais.	61

Figura 8. Perfis de amplificação de ISSR de *A. fumigatus* obtidos com o marcador (GTG)₅. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 1-10, 21 e 22: isolados ambientais, pistas 11-20, 23: isolados clínicos

Figura 9. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GTG)₅, obtidos de isolados de *A. fumigatus*. Números 1-10, 21 e 22: isolados ambientais, números 11-20, 23: isolados clínicos.

Figura 10. Perfis de amplificação de ISSR obtidos de *A. flavus* com o marcador (GTG)₅. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 24, 29-36: isolados clínicos, pistas 25-28, 37-39: isolados ambientais.

Figura. 11. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GTG)₅, obtidos de isolados de *A. flavus*. Números 24, 29-36: isolados clínicos, números 25-28, 37-39: isolados ambientais.

Figura 12. Perfis de amplificação de ISSR obtidos de *A. niger* com o marcador (GTG)₅. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 40, 46-53: isolados clínicos, pistas 41-45, 54-57: isolados ambientais.

Figura 13. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GTG)₅, obtidos de isolados de *A. niger*. Números 40, 46-53: isolados clínicos, números 41-45, 54-57: isolados ambientais.

Figura 14. Conídios de *A. fumigatus* URM6560 (A), *A. flavus* URM6315 (B) e *A. niger* URM6794 (C), após tratamentos com enzimas proteolíticas e glicolíticas, agente desnaturante e ácido concentrado em alta temperatura, contendo em sua parede celular partículas escuras de melanina (MO 4700X).

Figura 15. Conídios de *A. fumigatus* URM6560 (A e B), após tratamentos com enzimas proteolíticas e glicolíticas, agente desnaturante e ácido concentrado em alta temperatura (MEV 15000X e 2700X respectivamente).

Figura 16. Conídios de <i>A. flavus</i> URM6315 (A e B), após tratamentos com enzimas proteolíticas e glicolíticas, agente desnaturante e ácido concentrado em alta temperatura (MEV 10000X e 3500X respectivamente).	66
Figura 17. Conídios de <i>A. niger</i> URM6794 (A e B), após tratamentos com enzimas proteolíticas e glicolíticas, agente desnaturante e ácido concentrado em alta temperatura (MEV 15000X e 5000X respectivamente).	66
Figura 18. Espectro de infravermelho mostrando o perfil de melanina do isolado de <i>A. fumigatus</i> URM3550	70
Figura 19. Espectro de infravermelho mostrando o perfil de melanina do isolado de <i>A. flavus</i> URM6333	71
Figura 20. Espectro de infravermelho mostrando o perfil de melanina do isolado de <i>A. niger</i> 100B	71
Figura 21. Cromatograma do padrão comercial de gliotoxina pura.	74
Figura 22. Gráfico mostrando a porcentagem de isolados produtores (27%) e não produtores (73%) de gliotoxina, dentre 11 isolados de <i>A. fumigatus</i> de origem clínica depositados na Micoteca URM.	74
Figura 23. Gráfico mostrando a porcentagem de isolados produtores (42%) e não produtores (58%) de gliotoxina, dentre 12 isolados de <i>A. fumigatus</i> de origem ambiental depositados na Micoteca URM.	75
Figura 24. Cromatograma do isolado de <i>A. fumigatus</i> URM3812 produtor de gliotoxina.	75
Figura 25. Cromatograma do isolado de <i>A. fumigatus</i> URM6573, não produtor de gliotoxina.	76
Figura 26. Eutanásia com 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C) dos camundongos infectados com o isolado URM6753. A seta indica uma zona de aspecto diferenciado nos pulmões, pálida, indicando um possível foco de infecção.	77

- Figura 27. Lobos pulmonares direitos, com zona de aspecto diferenciado, pálido, indicando um possível foco de infecção. 78
- Figura 28. Exame direto de fragmentos de pulmão clarificado com KOH a 40%, mostrando filamentos micelianos hialinos, septados com e sem dicotomia (A e B). 78
- Figura 29. Verso (A) e reverso (B) do semeio de fragmentos de pulmão em meio Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (50mg/l), após 3 dias, mostrando o crescimento de colônias cotonosas com pontos granulares, cinza-esverdeada e reverso incolor. Microscopicamente (C) cabeças conidiais pequenas e colunares, vesículas, conidióforos de parede lisa e conídios globosos. 79
- Figura 30. Tecido pulmonar dos camundongos infectados, mostrando intenso infiltrado inflamatório com numerosos neutrófilos (A), neutrófilos (B), múltiplos granulomas (C), armadilhas extracelulares de neutrófilos (D e E) e presença de filamentos micelianos hialinos com e sem dicotomia (D, E, F). (HE 720x). As figuras A, C e E são provenientes de tecido infectado com o isolado URM6753, e as figuras B, D e F, são provenientes de tecido infectado com o isolado URM3812. 80

Lista de tabelas

	Pag.
Tabela 1. Isolados de <i>A. fumigatus</i> de acordo com a origem do substrato/hospedeiro.	50
Tabela 2. Isolados de <i>A. flavus</i> de acordo com a origem do substrato/hospedeiro	51
Tabela 3. Isolados de <i>A. niger</i> de acordo com a origem do substrato/hospedeiro.	52
Tabela 4. Produção de melanina por isolados de <i>A. fumigatus</i>	67
Tabela 5. Produção de melanina por isolados de <i>A. flavus</i>	68
Tabela 6. Produção de melanina por isolados de <i>A. niger</i>	69
Tabela 7. Médias dos pesos secos de partículas de melanina de isolados de <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i> .	70
Tabela 8. Concentrações de gliotoxina produzidas por isolados de <i>A. fumigatus</i> .	73

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1. O gênero <i>Aspergillus</i> Micheli ex Link (1809) e Aspergilose.....	19
3.2. <i>Aspergillus fumigatus</i> (Fresen. 1863).....	23
3.3. <i>Aspergillus flavus</i> (Link, 1809).....	27
3.4. <i>Aspergillus niger</i> (Tiegh. 1867).....	31
3.5. Identificação molecular e diversidade genética no gênero <i>Aspergillus</i>	33
3.6. Produção de melanina em espécies de <i>Aspergillus</i>	37
3.7. Produção de gliotoxina em espécies de <i>Aspergillus</i>	40
3.8. Estabelecimento de modelo animal em espécies de <i>Aspergillus</i>	45
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1. Obtenção das culturas.....	48
4.2. Estudo da variabilidade genética.....	48
4.2.1. Obtenção do micélio e extração do DNA.....	48
4.2.2. Análise da variabilidade genética dos isolados.....	49
4.2.3. Análise estatística.....	49
4.3. Produção e quantificação de partículas de melanina de conídios de <i>Aspergillus</i> ..	53

4.4. Análise ultraestrutural.....	54
4.5. Espectroscopia de Infravermelho (IR)	54
4.6. Produção de gliotoxina.....	54
4.6.1. Obtenção dos Extratos Brutos.....	54
4.6.2. Quantificação de gliotoxina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	55
4.6.3. Análise de gliotoxina produzida por <i>Aspergillus</i>	55
4.7. Estabelecimento de aspergilose pulmonar em modelo animal.....	56
4.7.1. Animais.....	56
4.7.2. Imunossupressão dos animais.....	57
4.7.3. Infecção experimental.....	57
5. RESULTADOS.....	58
5.1. Análise dos perfis de amplificação utilizando o marcador (GACA) ₄	58
5.2. Análise dos perfis de amplificação utilizando o marcador (GTG) ₅	61
5.3. Produção e quantificação de melanina.....	65
5.4. Espectroscopia de Infravermelho (IR).....	70
5.5. Produção de gliotoxina.....	72
5.6. Modelo experimental de aspergilose pulmonar.....	76
6. DISCUSSÃO.....	81
6.1. Análise da variabilidade genética.....	81
6.2. Produção e quantificação de melanina em espécies de <i>Aspergillus</i>	83
6.3. Produção e quantificação de gliotoxina em espécies de <i>Aspergillus</i>	86
6.4. Estabelecimento do modelo animal.....	88

7. CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXOS.....	107

1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas oportunistas aumentou significativamente nas últimas décadas, com destaque para aspergilose invasiva, uma importante fonte de morbidade e mortalidade para pacientes imunossuprimidos. Espécies de *Aspergillus* destacam-se como agentes de infecções fúngicas oportunistas; *A. fumigatus* é o principal agente de aspergilose, seguido de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. ustus* (Mirhendi *et al.*, 2007; Kupfahl *et al.*, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Camps *et al.*, 2012; Askew *et al.*, 2014).

O emprego de técnicas de biologia molecular para definir com mais exatidão as diferenças entre espécies de *Aspergillus* e ainda entre isolados de diferentes origens, integrado aos métodos de identificação clássica, oferece suporte a estudos epidemiológicos, permite mapear fatores e expressão de virulência e auxilia o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas (De Valk *et al.*, 2007; Rokas *et al.*, 2007; Staab *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2011).

A variabilidade genética de espécies de *Aspergillus* clinicamente relevantes tem valor diagnóstico, visto que certas espécies estão associadas à maior mortalidade, aumento de virulência e resistência à antifúngicos (Henry *et al.*, 2000; Balajee *et al.*, 2006; Ben-Ami *et al.*, 2010a), e diferenças nos perfis de suscetibilidade podem também indicar relevância clínica e adaptação de terapias antifúngicas (Staab *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2012).

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; Okumura *et al.*, 2004; Alp; Arikan, 2008; Kupfahl *et al.*, 2008; Chotirmall *et al.*, 2014).

A capacidade de produzir melanina, pigmento negro formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos, está associada à patogenicidade de vários fungos, como *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix schenckii*, e mais recentemente foi identificada em

Paracoccidioides brasiliensis e *Histoplasma capsulatum* (Youngchim *et al.*, 2004; Naggie; Perfect, 2009; Chai *et al.*, 2010).

A melanina encontrada em espécies de *Aspergillus* protege os conídios de fatores ambientais como calor, radiação ultra violeta (UV) e variações de pH, e *in vivo*, foi demonstrada sua ação protetora contra a ingestão por macrófagos e aumento da resistência ao oxigênio reativo produzido pelas células fagocíticas, o que demonstra uma vantagem de sobrevivência dentro e fora do hospedeiro e atua indiretamente como um fator de virulência (Sugui *et al.*, 2007a; Krishnan *et al.*, 2009; Pihet *et al.*, 2009; (Kwon-Chung; Sugui, 2013).

O principal gene responsável pela síntese de melanina em espécies de *Aspergillus* é o *alb1/pksP*, e estudos indicam que conídios despigmentados foram menos resistentes a fagocitose, o que demonstra que a melanina funciona como componente estrutural da parede de conídios, sendo necessária para a expressão de adesinas e outros fatores de virulência na superfície dos conídios, contudo, estudos mais aprofundados são necessários para esclarecer este papel (Pihet *et al.*, 2009).

Aspergillus fumigatus secreta numerosos metabólitos secundários, dentre os quais o de maior interesse é a gliotoxina, devido às suas potentes propriedades imunossupressoras e citotóxicas e ao fato de que pode ser facilmente detectada em soros de pacientes com aspergilose e durante infecção experimental, indicando um potencial fator de virulência (Sugui *et al.*, 2007b; Askew, 2008; Dagenais; Keller, 2009).

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

Através da execução de modelos experimentais, é possível avaliar e comparar a virulência de espécies de *Aspergillus* patógenas humanas, levando à uma melhor compreensão da patogenicidade característica destes fungos (Gravelat *et al.*, 2008). Deste modo, os objetivos deste trabalho foram analisar a diversidade genética em isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, quantificar a produção de melanina e gliotoxina destes isolados e estabelecer um modelo experimental de aspergilose pulmonar.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Quantificar a produção de melanina e gliotoxina, analisar a diversidade genética e estabelecer um modelo experimental de aspergilose pulmonar.

2.2. Objetivos Específicos

- Quantificar melanina e gliotoxina em isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* depositados na Micoteca URM e isolados a serem depositados nesta coleção;
- Analisar a diversidade genética por marcadores moleculares;
- Estabelecer um modelo experimental de aspergilose pulmonar.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O gênero *Aspergillus* Micheli ex Link (1809) e Aspergilose

O gênero *Aspergillus* agrega espécies encontradas no solo e vegetais em decomposição (Raper; Fennel, 1977; Klich, 2002; Lacaz *et al.*, 2002). São amplamente distribuídas na natureza e esporulam abundantemente, dispersando os conídios no ambiente, sendo relatados como um dos mais frequentes agentes de doença fúngica localizada e invasiva para pacientes imunossuprimidos, e mais raramente, em pacientes aparentemente imunocompetentes (Varkey; Perfect, 2008; McCormick *et al.*, 2010; Webb; Vikram, 2010; Stevens; Melikian, 2011; Kousha *et al.*, 2011; Ergene *et al.*, 2013; Askew *et al.*, 2014).

A nomenclatura do gênero, dada pelo sacerdote e botânico Antonio Micheli, provém da semelhança de sua estrutura reprodutiva assexual, o conidióforo, com o aspersório, um instrumento usado para dispersar a água benta aos fiéis em alguns serviços litúrgicos cristãos (Kousha *et al.*, 2011; Gibbons, Rokas, 2012; Ergene *et al.*, 2013).

Em seu clássico tratado de 1965 sobre o gênero, Raper e Fennell reconheceram 132 espécies de *Aspergillus*, mas a atualização e aplicação sistemática de uma abordagem polifásica utilizando dados morfológicos, fisiológicos e moleculares para identificar e classificar novas espécies, incluindo várias consideradas problemáticas, resultou na descrição de mais de 250 espécies. O ritmo de descobertas de novas espécies continua crescente, com cerca de 50 novas espécies descritas neste século. A revisão taxonômica provida pela genômica do gênero tem influenciado dramaticamente a concepção e aplicação de técnicas moleculares para identificar espécies clinicamente importantes, e auxiliou também na identificação de novas espécies de interesse médico (Pitt; Samsom, 2007; Samsom *et al.*, 2007a, b, c; Gibbons, Rokas, 2012).

Espécies de *Aspergillus* são ubíquas; fungos sapróbios que desempenham um papel significativo na reciclagem global do carbono e nitrogênio. Embora o seu nicho ecológico primário seja o solo ou matéria vegetal em decomposição, os pequenos conídios hidrofóbicos se dispersam facilmente no ar e podem sobreviver a uma ampla gama de condições ambientais. Os representantes do gênero causam um enorme impacto sobre a humanidade, tanto benéfica, como sendo o principal dentre os fungos com aplicações

industriais, tanto negativamente, atuando como patógenos de plantas e animais, além de produzirem micotoxinas, dentre estas a altamente tóxica aflatoxina, que é carcinogênica, e a gliotoxina, imunossupressora e citotóxica (Askew, 2008; Kupfahl *et al.*, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Kousha *et al.*, 2011).

Várias espécies foram descritas como patogênicas para humanos, como *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. ustus* (De Valk *et al.*, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Kousha *et al.*, 2011; Camps *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2014). Para invadir o hospedeiro, espécies de *Aspergillus* precisam aderir e penetrar os tecidos, e 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; Okumura *et al.*, 2004; Alp; Arikan, 2008; Chotirmall *et al.*, 2014).

Dependendo do estado imunológico do hospedeiro, a aspergilose pode apresentar quatro formas clínicas: aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) causada por uma hipersensibilidade para antígenos de *Aspergillus*; aspergiloma, ou bola fúngica (*fungus ball*), onde o fungo se desenvolve em cavidade preexistente no pulmão, sendo esta a forma mais comum e melhor reconhecida de envolvimento pulmonar; aspergilose crônica semi-invasiva, também chamada de aspergilose crônica necrotizante, processo infeccioso cavitário indolor do parênquima pulmonar secundário a invasão local através de espécies de *Aspergillus*; e aspergilose invasiva (AI), caracterizada pela proliferação das hifas no parênquima pulmonar, causando pneumonite necrotizante com invasão dos vasos pulmonares, conduzindo à hemorragias e infartos (Sánchez; Viña, 2004; Zmeili; Soubani, 2007; Goldenberg; Price, 2008).

A principal via de infecção é a inalatória: os esporos assexuados são difundidos no ambiente e pequenos o suficiente para alcançar os alvéolos pulmonares. Em indivíduos imunocompetentes, as defesas do organismo são eficazes em eliminar estes esporos, no entanto, quando o sistema imunológico está comprometido, os conídios podem germinar em hifas e estabelecer um foco de infecção dentro do pulmão, sendo este o órgão mais comumente acometido, podendo disseminar para outros órgãos, com manifestações graves. AI é a forma clínica mais severa, tornando-se um problema crescente (Askew, 2008; De

Valk *et al.*, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Hummel *et al.*, 2009; McCormick *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2014).

Após a penetração da camada epitelial dos alvéolos, o fungo imediatamente entra em contato direto com os vasos sanguíneos subjacentes, devido à essa afinidade pelos vasos sanguíneos, *A. fumigatus* é denominado angiotrófico, e a invasão dos vasos sanguíneos é uma característica histopatológica da aspergilose (Ben-Ami *et al.*, 2009; McCormick *et al.*, 2010).

Aspergilose invasiva é, talvez, a mais devastadora forma clínica, atingindo severamente pacientes imunossuprimidos. Aqueles com maior risco são indivíduos com doenças hematológicas, como a leucemia, quimioterapia, transplantados de células-tronco ou de órgãos sólidos e medula óssea, pacientes em terapia prolongada com corticosteróides, que é comumente utilizada para a prevenção e/ou tratamento da doença do enxerto-versus-hospedeiro em transplantados; indivíduos com imunodeficiências genéticas, como a doença granulomatosa crônica (DGC) e os indivíduos infectados com vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Menotti *et al.*, 2005; Dagenais; Keller, 2009).

O estabelecimento da AI é decorrente de várias condições incluindo alterações da função dos macrófagos e neutrófilos, transplantes de medula óssea e órgãos sólidos, neutropenia, corticoidoterapia prolongada, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e síndrome da imunodeficiência humana (aids), doença granulomatosa crônica, sarcoidose, queimaduras severas, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), permanência hospitalar prolongada, antibioticoterapia múltipla prolongada, diabetes *mellitus*, alcoolismo, nutrição parenteral, dependência química e desnutrição (Sánchez; Viña, 2004; Zmeili; Soubani, 2007; Wheat, 2009; Goldenberg; Price, 2008; Kousha *et al.*, 2011; Armstrong-James *et al.*, 2014).

As manifestações clínicas são inespecíficas, variando de dispnéia, febre e tosse produtiva prolongada com hemoptise e dor torácica, sintomas que podem ser sugestivos de inúmeras doenças respiratórias. Esta similaridade de sinais e sintomas pode atrasar o diagnóstico clínico ou mesmo levar ao equívoco, e consequentemente, retardar o tratamento adequado (Sánchez; Viña, 2004; Kant; Sanjay, 2007; Zmeili; Soubani, 2007; Goldenberg; Price, 2008; Xavier *et al.*, 2009; Kousha *et al.*, 2011).

Surtos nosocomiais de aspergilose têm sido relatados, sendo atribuídos principalmente à construção, reforma, demolição e atividades de escavação. Isto é plausível, visto que já se demonstrou que trabalhos de demolição e reforma aumentam dramaticamente a quantidade de esporos fúngicos aerotransportados, e conseqüentemente, aumentam o risco de infecções por *Aspergillus* em pacientes suscetíveis (De Valk *et al.*, 2008; Guinea *et al.*, 2011).

A ocorrência de surtos nosocomiais de AI relacionada com hospitais ou obras de demolição descreve o provável papel do ambiente na infecção. Contudo, a prova da origem de uma infecção nosocomial só pode ser estabelecida de forma definitiva comprovando a identidade das estirpes isoladas a partir de pacientes infectados (Menotti *et al.*, 2005; Askew, 2008; Dagenais; Keller, 2009).

Aspergilose invasiva é um problema crescente para pacientes com sequela de tuberculose - um dos principais fatores predisponentes para o surgimento de colonização fúngica-, DPOC, fibrose cística e pacientes internados em ambiente hospitalar em razão de transplantes de medula óssea e órgãos sólidos e tratamento com corticosteróides. Espécies de *Aspergillus* destacam-se como agentes de infecções fúngicas oportunistas e neste gênero, *A. fumigatus* é o mais frequente seguido de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* (Khan *et al.*, 2003; Sánchez; Viña, 2004; Unis *et al.*, 2005; De Valk *et al.*, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Jonhson *et al.*, 2014).

Em indivíduos com função pulmonar alterada, causada por asma ou fibrose cística, *A. fumigatus* pode causar aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), uma reação de hipersensibilidade a componentes fúngicos. Aspergilomas não invasivos podem se formar devido à exposição repetida a conídios em cavidades pulmonares preexistentes, como as lesões cicatrizadas em pacientes pós-tuberculose (Dagenais; Keller, 2009).

A virulência pode ser definida como a infecciosidade relativa de um microrganismo causador de doença ou a capacidade de superar as defesas naturais do hospedeiro. Esta definição descreve a natureza quantitativa do conceito e permite a inclusão de propriedades particulares do parasita. Ela também identifica o hospedeiro como um fator importante nesta interação, ainda que com poucos detalhes (Perfect, 1996; Davis, 2009).

Vários candidatos à genes de patogenicidade foram previamente identificados por análise em cultura de macrófagos ou em modelos animais de aspergilose invasiva. Estes

genes codificam proteínas envolvidas em vias metabólicas centrais, sinalização, a biossíntese da parede celular, biossíntese de pigmentos e regulação da produção de metabólitos secundários (Nierman *et al.*, 2005; Abad *et al.*, 2010; Gibbons, Rokas, 2012).

Espécies de *Aspergillus* destacam-se como agentes de infecções fúngicas oportunistas e neste gênero, *A. fumigatus* é o mais frequente seguido de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* (De Valk *et al.*, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Jonhson *et al.*, 2014).

3.2. *Aspergillus fumigatus* (Fresen. 1863)

Aspergillus fumigatus é singular entre os microrganismos, sendo tanto um agente patogênico primário e oportunista bem como um grande alérgeno. É o principal patógeno fúngico de propagação aérea, ubíquo no meio ambiente, sua produção de conídios é prolífica e a exposição do trato respiratório humano é quase constante. Dentre as espécies patogênicas humanas, é o principal agente causador de doenças em humanos, responsável por doenças alérgicas, aspergiloma e aspergilose invasiva (AI). Em indivíduos imunossuprimidos, a incidência da infecção invasiva pode alcançar a 50% (Nierman *et al.*, 2005; Askew, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Guinea *et al.*, 2011; Osharov, 2012; Kwon-Chung; Sugui, 2013).

Com base nas características morfológicas, os membros do complexo *A. fumigatus*, pertencem ao subgênero *Fumigati*, seção *Fumigati*, e são identificados por apresentarem colônias de crescimento rápido (5-7 cm após 10 dias a 28°C), no início do desenvolvimento, em meio ágar Czapek (CZ), apresentam coloração branca, que com o passar dos dias torna-se verde azulada ou azul acinzentada, de reverso creme, amarelo, verde escuro ou marrom escuro. Microscopicamente, apresentam cabeças conidiais colunares, vesículas (16-30µ) em forma de balão e fiálides unisseriadas, conidióforos de parede lisa com conídios globosos (2,5µ) a subglobosos de coloração verde oliva e apresentando sua superfície ligeiramente equinulada (Balajee, Marr, 2006; Pitt; Samsom, 2007; Samsom *et al.*, 2007a, b, c).

Os métodos convencionais de identificação de *A. fumigatus*, baseados nas suas características morfológicas e microscópicas, em várias ocasiões podem não ser eficazes, devido a fatores como: esporulação lenta e escassez de taxonomistas com experiência. Outras espécies, como as do gênero *Neosartorya*, teleomorfo de *Aspergillus*, são capazes

de produzir ascosporos, no entanto, um considerável período de tempo é necessário para a produção destes, portanto, não é um método prático e rápido de identificação para os laboratórios de micologia clínica. Embora para taxonomistas muito experientes as espécies incluídas na seção *Fumigati* sejam morfológicamente heterogêneas, a observação morfológica não é suficiente para distingui-las. Este fato tem levado a erros na identificação de espécies e também ao descarte de organismos como contaminantes (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008).

A fim de solucionar este problema, diferentes técnicas foram desenvolvidas e utilizadas para identificar as espécies pertencentes a esta seção, como a análise dos perfis de metabólitos secundários, análise de padrão de enzimas por eletroforese e análise de dados moleculares, como o sequenciamento parcial dos genes da região ITS, β -tubulina, calmodulina e actina (Samsom *et al.*, 2007a; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008; Balajee *et al.*, 2009).

Até pouco tempo, *A. fumigatus* era conhecido por se reproduzir apenas assexuadamente, porém o acúmulo de evidências a respeito da recombinação e fluxo de genes em estudos sobre a população genética, da análise do genoma, da presença de genes de acasalamento e expressão de genes relacionados ao sexo, foi revelado que *A. fumigatus* possui um ciclo de reprodução sexuada totalmente funcional que leva à produção de cleistotécios e ascosporos, que levaram a descrição do teleomorfo *Neosartorya fumigata* (Nierman *et al.*, 2005; O’Gorman *et al.*, 2009).

A presença de um ciclo sexual fornece uma ferramenta de valor inestimável para compreensão sobre a presença de diversos genótipos, conservação de genes relacionados com o sexo, aspectos da evolução do genoma e defesa contra elementos repetitivos. Além disso, os ascosporos podem contribuir para a sobrevivência em condições ambientais adversas. A descoberta tem implicações clínicas significativas, visto que a reprodução sexual pode resultar em prole com o aumento da virulência ou resistência a agentes antifúngicos. A recombinação em populações assexuadas é muitas vezes atribuída a reprodução parassexual. No entanto, a parassexualidade está limitada a isolados do mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (O’Gorman *et al.*, 2009).

Aspergillus fumigatus possui características fisiológicas e moleculares específicas que tornam este fungo um patógeno singular e potencialmente perigoso para indivíduos com fatores predisponentes. Não possui características de virulência sofisticadas, no

entanto, é capaz de estabelecer a infecção devido a sua eficiência e capacidade para se adaptar a uma vasta gama de condições ambientais (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009; McCormick *et al.*, 2010; Kwon-Chung; Sugui, 2013).

É evidente que a patogenicidade em *A. fumigatus* é multifatorial, envolvendo redes de genes que provavelmente evoluíram para dar suporte ao organismo em seu nicho ecológico primário e a análise do genoma deste fungo revelou estes genes como potenciais alvos terapêuticos (Krappmann *et al.*, 2004; O’Gorman *et al.*, 2009; Ben-Ami *et al.*, 2010b; Sales-Campos *et al.*, 2013).

Uma vez que a capacidade de *A. fumigatus* para assimilar nutrientes a partir de um complexo de substratos requer a secreção das enzimas extracelulares, como proteases e fosfolipases, o progressivo crescimento de hifas dentro do pulmão, eventualmente, danifica a barreira epitelial, que dá acesso ao espaço interalveolar onde o fungo pode penetrar nos vasos sanguíneos. Fragmentos de hifas podem migrar livremente para locais distantes, e infecção disseminada possui um mau prognóstico (Askew, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Hummel *et al.*, 2009; Guinea *et al.*, 2011).

Esta espécie é particularmente termotolerante: sua temperatura ótima varia de 37°C a 42°C, podendo crescer até a 55°C, se aproximando assim do limite de temperatura dos outros organismos eucarióticos. Isto sugere que este organismo desenvolveu mecanismos distintos da resistência ao estresse que podem constituir a base da sua virulência (Askew, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Hummel *et al.*, 2009; Guinea *et al.*, 2011).

A presença do pigmento melanina na superfície dos conídios de *A. fumigatus* também pode ser considerado um fator de virulência, visto que na natureza a melanina exerce uma barreira de proteção contra agentes oxidantes, temperaturas extremas, radiação ultra violeta (UV), e *in vivo* foi demonstrado que sua presença promove resistência a mudanças de osmolaridade, variações de temperatura, à fagocitose, a reações de estresse oxidativo, à lise celular e resistência a antimicrobianos (Nosanchuk; Casadevall, 2003; Hohl; Feldmesser, 2007; Urán; Cano, 2008; Heinekamp *et al.*, 2012; (Kwon-Chung; Sugui, 2013; Bayry *et al.*, 2014).

Aspergillus fumigatus secreta numerosos metabólitos secundários, que acredita-se proporcionar 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 intensas propriedades imunossupressoras, citotóxicas e antiangiogênicas e ao fato de que pode ser facilmente detectada durante a infecção experimental e em soros de pacientes com aspergilose (Rementeria *et al.*, 2005; Kamei; Watanabe, 2005; Askew, 2008; Dagenais; Keller, 2009; Hummel *et al.*, 2009; Fallon *et al.*, 2011; Guinea *et al.*, 2011; Kwon-Chung; Sugui, 2013; Bugli *et al.*, 2014).

A capacidade de produzir uma matriz extracelular (MEC) com características de biofilme já foi relatada *in vitro* e *in vivo* para *A. fumigatus*. A MEC é constituída de galactomanana, α -1,3-glucanas, mono e polissacarídeos, melanina, e proteínas, incluindo os principais antígenos e hidrofobinas, que é capaz de reduzir a suscetibilidade às drogas antifúngicas (Seidler *et al.*, 2008; Loussert *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2011; Rajendran *et al.*, 2011; Bugli *et al.*, 2014).

A. fumigatus é caracterizado por seu angiotropismo e propensão para angioinvasão. A aspergilose invasiva é estabelecida quando esporos assexuais são inalados por hospedeiros suscetíveis e germinam dentro dos espaços alveolares, penetrando no epitélio respiratório e endotélio vascular. A invasão vascular por *A. fumigatus* promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da cascata de coagulação, resultando em trombose intravascular e isquemia tecidual. Estes eventos podem resultar no sequestro do tecido infectado, limitando o fornecimento de células efectoras imunitárias e antifúngicos para o local da infecção. A proliferação extensiva e necrose coagulativa fúngica são características particularmente proeminentes de aspergilose invasiva em hospedeiros com deficiências quantitativas ou qualitativas de leucócitos polimorfonucleares (Ben-Ami *et al.*, 2009; McCormick *et al.*, 2010).

As taxas de mortalidade estão entre 40% a 90% em populações de alto risco e são dependentes de fatores como estado imunológico do hospedeiro, local da infecção e regime de tratamento aplicado. A gravidade e incidência aumentada de AI apontam para a necessidade de uma melhor compreensão da interação entre hospedeiro e fungo, e quais fatores contribuem para a patogênese de *A. fumigatus* (Dagenais; Keller, 2009; Askew *et al.*, 2014).

3.3. *Aspergillus flavus* (Link, 1809)

O segundo mais frequente agente de AI (aproximadamente 15-20%) é *A. flavus*. Com sua capacidade única para sobreviver a temperaturas mais elevadas, de até 48°C, é o patógeno predominante em países com condições áridas, incluindo a maior parte do Oriente Médio, África e Sudeste Asiático, representando 50-80% dos casos das infecções cutâneas, sinusite e ceratite em humanos (Krishnan *et al.*, 2009; Cleveland *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2011).

Aspergillus flavus é uma espécie notável, visto que parasita vários hospedeiros, incluindo humanos, animais e plantas e é o patógeno predominantemente envolvido na produção das aflatoxinas. Além dos ambientes em que normalmente são encontrados esporos de *Aspergillus*, os conídios de *A. flavus* são facilmente isolados em grãos estocados, como amendoim e milho. A alta frequência de comprometimento da função pulmonar e doenças respiratórias alérgicas, incluindo asma têm sido relatadas em agricultores de todo o mundo (Hedayati *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2008; Krishnan *et al.*, 2009).

Os representantes de *A. flavus* pertencem ao subgênero *Circumdati*, seção *Flavi*, sendo caracterizados por colônias de crescimento moderadamente rápido (3,5-5 cm após 10 dias a 28°C) ou rápido (6-7,5 cm após 10 dias a 28°C), em CZ, de aspecto flocoso a granular, ocasionalmente apresentam sulcos radiais, ou de aspecto cerebriforme, coloração verde amarelada ou, raramente, marrom amarelado com reverso creme ou rosado; produção, em várias cepas, de esclerócio marrom escuro a preto, particularmente em colônias jovens. As características microscópicas incluem cabeças conidiais unisseriadas e bisseriadas, principalmente radiadas; vesículas esféricas com métulas ocupando quase toda sua superfície; estipes hialinos ou de coloração marrom pálida, além de apresentar superfície de aspecto rugoso, e conídios (5-7µ) globosos ou elipsoides, apresentando superfície lisa ou ligeiramente rugosa (Pitt; Samsom, 2007; Samsom *et al.*, 2007a, b, c).

Os métodos de identificação clássicos de espécies da seção *Flavi* são baseados na análise das características morfológicas macro e micromorfológicas observadas em culturas de fungos em diferentes meios de cultura, além de perfis de metabólitos (Balajee; Marr, 2006; Samsom *et al.*, 2007a). No entanto, estes procedimentos são demorados, exigem conhecimentos específicos de taxonomia e são imprecisos porque existem

variabilidade morfológica e de perfil de metabólitos entre isolados da mesma espécie (Hedayati *et al.*, 2007; Godet; Munaut, 2010).

Várias técnicas de genética molecular têm sido empregadas para definir espécies dentro da seção *Flavi*: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), uso de enzimas de restrição, e análise de sequências parciais do gene do citocromo b mitocondrial. Embora esses estudos tenham fornecido informações importantes sobre as relações filogenéticas entre as espécies do grupo, nenhum deles empregado isoladamente foi capaz de elucidar os problemas de identificação (Hedayati *et al.*, 2007; Godet; Munaut, 2010).

O sequenciamento do genoma de *A. flavus* mostrou uma grande semelhança entre este organismo e *A. oryzae*, o que é muito interessante, visto que *A. flavus* é um organismo comumente isolado do ambiente, patogênico e produtor de toxinas, ao passo que *A. oryzae* é amplamente utilizado pela indústria alimentícia na fermentação de soja, entre outros usos, e raramente causa doença. A similaridade entre estes organismos é notável e intrigante, e mesmo ainda não elucidada, indica uma relação evolutiva extremamente próxima (Hedayati *et al.*, 2007; Cleveland *et al.*, 2009).

Vários trabalhos (Chang *et al.*, 2004; Hedayati *et al.*, 2007; Godet; Munaut, 2010; Nakamura *et al.*, 2011) destacam que os dois genes reguladores de várias etapas enzimáticas envolvidas na biossíntese da aflatoxina, *aflT* e *aflR* e a região ITS são bons candidatos para posteriores investigações taxonômicas. Sequenciamento parcial dos genes da região ITS têm sido usado para diferenciar entre espécies do complexo *flavus*, assim como os genes da β -tubulina, calmodulina e actina (Samsom *et al.*, 2007a; Balajee *et al.*, 2009; Samsom; Varga, 2009; Godet; Munaut, 2010).

O estado sexual de *A. flavus* foi descrito a partir de cruzamentos entre linhagens compatíveis, cujo teleomorfo pertence ao gênero *Petromyces*. O teleomorfo de *A. flavus* não pode ser distinguido do de *A. parasiticus*, outra espécie produtora de aflatoxinas, com base na morfologia das estruturas sexuais, contudo as duas espécies podem ser separadas pela morfologia do anamorfo, perfil de micotoxinas e características moleculares (Horn *et al.*, 2009).

Uma das características das populações de *A. flavus* é a diversidade genética extrema, como refletido por diferenças na morfologia e produção de micotoxinas (Horn *et al.*, 2009).

Culturas de *A. flavus* foram caracterizadas como produtoras de proteases, entre estas a aspartil proteinase (SAP), serina proteinase (SP), as metaloproteinases (PM), protease alcalina, e também de lipases. Estudos celulares, bioquímicos e moleculares indicam que uma ou mais destas enzimas extracelulares atuam como fator de virulência no processo da infecção (Krishnan *et al.*, 2009).

Recentemente, a melanina, pigmento fúngico que desempenha um importante papel na virulência de vários fungos, foi extraída e quantificada em isolados de *A. flavus* de ceratite fúngica e depositados em coleções, tendo sido ainda identificada a via biossintética pela qual esta espécie a produz (Pal *et al.*, 2014).

Sem dúvida, a característica mais marcante de *A. flavus* é a capacidade de produzir aflatoxinas, que também são produzidas por *A. parasiticus*. Este grupo de toxinas é um dos mais potentes carcinogênicos, e são conhecidas por induzirem carcinoma hepatocelular em humanos. A população em geral é exposta a aflatoxinas principalmente pela ingestão de alimentos contaminados, como grãos e derivados, além do consumo de carne, ovos, leite e outros produtos comestíveis de animais que consomem ração contaminada são fontes adicionais de exposição potencial. As más condições de armazenamento destes alimentos básicos e a presença de alta umidade e temperatura fornecem um ambiente ideal para o crescimento deste organismo em instalações de armazenamento contaminados (Hedayati *et al.*, 2007; Pildain *et al.*, 2008; Krishnan *et al.*, 2009).

Como a maioria das outras micotoxinas, estes compostos são produzidos como metabólitos secundários e ainda não se conhece o seu papel específico na biologia destes organismos. Os quatro principais tipos de aflatoxinas são B1 (peso molecular 312,3 Da), B2 (peso molecular 314,3 Da), G1 (peso molecular 328,3 Da) e G2 (peso molecular 330,3 Da), com base na cor fluorescente quando expostos à luz ultravioleta (B = fluorescência azul; G = fluorescência verde-amarelo). A aflatoxina M1, que pode ser encontrada na ausência de outros aflatoxinas, é o principal produto da hidroxilação metabólica da aflatoxina B1 (Hedayati *et al.*, 2007; Pildain *et al.*, 2008; Krishnan *et al.*, 2009).

Aflatoxinas são ligeiramente solúveis em soluções aquosas, solventes orgânicos moderadamente polares e insolúveis em solventes não-polares. São instáveis quando

expostos a agentes oxidantes, luz ultravioleta ou soluções com um pH inferior a 3 e superior a 10. Estes compostos não são destruídos em altas temperaturas, mas podem ser completamente destruídos na esterilização em autoclave, na presença de amoníaco ou por tratamento com alvejantes (Krishnan *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos sugerem que o processo de doença pode ser potencializado pelas aflatoxinas, particularmente no hospedeiro neutropênico/imunossuprimido. Se isto se confirmar, a ação desta classe de compostos será indireta, inibindo a função dos neutrófilos do hospedeiro (Krishnan *et al.*, 2009).

Uma outra toxina cuja presença foi evidenciada em culturas de *A. flavus* é a gliotoxina, que regula um largo espectro de efeitos supressivos sobre o sistema imunológico: inibição da função de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células T citotóxicas, indução da apoptose, bloqueio da produção de citocinas, da apresentação do antígeno e da atividade ciliostática sobre as células epiteliais do aparelho respiratório (Nishida *et al.*, 2005; Kupfahl *et al.*, 2006; Hohl; Feldmesser, 2007; Scharf *et al.*, 2012). Estudos mostram que em isolados de *A. flavus* provenientes de diversos espécimes clínicos, a produção de gliotoxina varia entre 4% e 13% (Kupfahl *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2005a).

Aspergillus flavus é responsável por aproximadamente 10% de infecções broncopulmonares. A baixa incidência de infecções causadas por essa espécie, quando comparada com *A. fumigatus* poderia estar relacionada com características das espécies, distribuição no ambiente ou fatores do hospedeiro. Araújo e Rodrigues (2004) avaliaram vários parâmetros associados à germinação de conídios de diferentes espécies de *Aspergillus*, e descobriram que o meio humano interno fornece as condições ideais para o desenvolvimento de doença invasiva por *A. fumigatus*, mas restrito à invasão por *A. flavus* e *A. niger*, além do fato de que os conídios de *A. flavus* têm dimensões maiores dos que os de *A. fumigatus*, o que favorece sua retenção no trato respiratório superior, enquanto que os conídios menores de *A. fumigatus* vão adiante, até o trato respiratório inferior (Pasqualotto, 2009).

Os sintomas pulmonares da infecção por *A. flavus* não são diferentes das causadas por *A. fumigatus*, podendo assumir a forma de aspergiloma, aspergilose pulmonar invasiva ou aspergilose traqueobrônquica. É notável que formas alérgicas de aspergilose especificamente causada por *A. flavus* não foram relatadas. Isto pode estar relacionado com

a variabilidade inter-espécies provocando uma hipersensibilidade em resposta a estimulação antigênica. Aspergilomas assintomáticos secundários por *A. flavus* são raros. Pode apresentar-se ainda nas formas de ceratite, infecção cutânea, sinusite, infecção óssea, endocardite e mais raramente, infecções urinárias em pacientes diabéticos (Hedayati *et al.*, 2007; Krishnan *et al.*, 2009).

3.4. *Aspergillus niger* (Tiegh. 1867)

Aspergillus niger é a terceira espécie mais relatada como causa de aspergilose invasiva e aspergiloma, sendo normalmente mais associado à otomicoses, infecções cutâneas e doença pulmonar localizada (Araiza *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008; Mohapatra *et al.*, 2009; Howard *et al.*, 2011; Ergene *et al.*, 2013). Há poucos relatos de *A. niger* causando pneumonia (Person *et al.*, 2010) e infecção de aorta (Jamieson *et al.*, 2011).

Aspergillus niger também pertencem ao subgênero *Circumdati*, porém estão classificados na seção *Nigri*; apresentando, assim, colônias de crescimento rápido (4,5-6,5cm em 10 dias a 28°C) em CZ, frequentemente com sulcos radiais, granulares, inicialmente de coloração branca a amarela, tornando-se preta com reverso creme ou amarelo pálido. Na microscopia, são caracterizados por cabeças conidiais bisseriadas e radiais; vesícula esférica e métulas ocupando toda a sua superfície; estipes de parede espessa, lisa, podendo ser hialina ou pigmentada da cor marrom ou amarelo pálido; e conídios (3,4-4,5µ) de coloração marrom, globosos ou subglobosos, de paredes espessas e ornamentadas (Pitt; Samsom, 2007; Samsom *et al.*, 2007a, b, c).

Apesar de sua importância, a taxonomia da seção *Nigri* dentro do gênero *Aspergillus* permanece um tanto quanto mal definida. A sessão é composta por um grupo de organismos intimamente relacionados, que são difíceis de distinguir morfológicamente. Como resultado, no laboratório clínico, relatos de todas as espécies de *Aspergillus* negros como *A. niger* com base em técnicas clássicas (morfologia das colônias, tamanho dos conídios, ornamentação) é quase universal, mas podem não ser de isolados de *A. niger*, mas de uma espécie estritamente relacionada dentro da seção *Nigri* (Howard *et al.*, 2011).

Mais recentemente, os métodos não baseados na morfologia têm sido utilizados para diferenciar estas espécies, incluindo os padrões de extrólitos, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e polimorfismo de fragmentos de

restrição (PCR-RFLP). No entanto, a taxonomia da seção principal tem sido aperfeiçoada através de sequenciamento do DNA da região do espaço interno transcrito (ITS) e sequenciamento parcial dos genes para a β -tubulina, calmodulina e actina. Uma abordagem polifásica com alvos moleculares tem se mostrado promissora (Howard *et al.*, 2011).

O sequenciamento do genoma de uma cepa padrão de *A. niger* mostrou que este fungo está intimamente relacionado à *A. terreus* e *A. oryzae* e distante de *A. fumigatus*, *A. clavatus* e *A. nidulans*. Este avanço pode otimizar o desenvolvimento de novos produtos industriais, melhorar geneticamente cepas e garantir processos enzimáticos mais eficientes. Ainda não foram demonstradas evidências de uma fase sexual para este fungo, embora o sequenciamento do genoma tenha mostrado um conjunto completo de genes relacionados ao desenvolvimento sexual, aparentemente funcionais, o que reforça a possibilidade da descoberta futura da reprodução sexuada, como ocorreu anteriormente para outros representantes do gênero *Aspergillus* (Pel *et al.*, 2007).

Conídios de espécies pertencentes aos *Aspergillus* negros variam de verde-oliva ou marrom a preto, embora algumas espécies produzam esporos de um leve tom de marrom (Samson *et al.*, 2007b). A pigmentação aparente destes *Aspergillus* é resultado da combinação de pigmentos marrons e verdes, que absorvem a luz do espectro visível (Ray, Eakin, 1975). Ray e Eakin (1975) foram os primeiros a propor que o pigmento nativo, aspergilina, com um tamanho molecular de cerca de 20.000 kD é formado a partir de duas moléculas precursoras: o primeiro componente precursor é um pigmento verde de baixo peso molecular (368 kD) e tem sido identificado como um quinóide pentacíclico hexahidroxil (HPQ). O segundo componente é constituído por um precursor castanho bem caracterizado de baixo peso molecular (5000 kD), o pigmento melanina (Tsai *et al.*, 1999; Baker, 2008; Jorgensen *et al.*, 2011).

A melanina é reconhecida por seu papel protetor contra agentes agressores na natureza, assim como desempenha um importante papel na virulência de espécies de *Aspergillus*. Recentemente, foi comprovado que a melanina presente nos conídios de *A. niger* é sintetizada pela via DOPA (Nosanchuk; Casadevall, 2006; Heinekamp *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2014).

Além de sua importância clínica, estes fungos secretam uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas, além de produzirem ácido cítrico e ácido glucônico, sendo assim de grande potencial biotecnológico (Palencia *et al.*, 2010; Howard *et al.*,

2011). Na agricultura destacam-se por contaminarem principalmente grãos, resultando em enormes perdas econômicas e também pela produção de ocratoxina A, uma potente nefrotoxina e potencial carcinógeno, e as também micotoxinas fumonisina B2 e aflatoxina em grãos armazenados, as quais causam a descoloração, deterioração da qualidade e redução nos valores comerciais, e dependendo da quantidade ingerida, podem afetar fígado, rins, esôfago e sistema nervoso de humanos e animais que consomem a ração produzida a partir destes insumos contaminados (Frisvad *et al.*, 2007; Wild; Gong *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2011; Person *et al.*, 2010; Gautam *et al.*, 2011).

A produção de gliotoxina foi relatada em isolados clínicos e ambientais de *A. niger* variando de 44% a 75% entre os isolados estudados (Lewis *et al.*, 2005b; Nishida *et al.*, 2005; Kupfahl *et al.*, 2008; Hohl; Feldmesser, 2007; Scharf *et al.*, 2012).

3.5. Identificação molecular e diversidade genética no gênero *Aspergillus*

Espécies de *Aspergillus* são tradicionalmente identificadas pela taxonomia clássica, baseada em características macro e micromorfológicas, tais como tamanhos e formas de várias estruturas, diâmetro da colônia e produção de pigmentos. Além das características morfológicas, outras técnicas também estão sendo utilizadas incluindo dados sobre metabólitos, aferidos por cromatografia e espectrometria de massa, além de estudos moleculares (Klich, 2002; Balajee *et al.*, 2006; Samsom *et al.*, 2006; Mirhendi *et al.*, 2007; Samsom *et al.*, 2007A; Staab *et al.*, 2009; Soleiro *et al.*, 2013).

No entanto, os resultados dos estudos moleculares recentes demonstram que vários isolados de *A. fumigatus* identificados fenotipicamente podem ser geneticamente distintos, além de diferirem entre isolados de pacientes diferentes e do ambiente (Balajee *et al.*, 2005; De Valk *et al.*, 2008; Staab *et al.*, 2009; Guinea *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2012; Soleiro *et al.*, 2013). Tem sido demonstrado que *A. fumigatus* pode existir na natureza como dois subgrupos geneticamente diferentes: um grupo que progride essencialmente no ar e outro grupo bem adaptado para a sobrevivência em água, ambos os grupos que causam AI em seres humanos (Warris *et al.*, 2003; Balajee *et al.*, 2006).

Balajee *et al.* (2005) relatam a existência de uma nova espécie de *Aspergillus* de importância médica, *A. lentulus*, dentre isolados clínicos da Coreia, Holanda, Austrália e Japão, previamente identificados como *A. fumigatus*. Esta descoberta só foi possível

devido ao emprego da técnica de amplificação por PCR - RFLP e posterior análise de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). *A. lentulus* demonstra uma sensibilidade reduzida aos antifúngicos utilizados atualmente para AI, incluindo Anfotericina B e Voriconazol.

Em outro estudo do mesmo grupo (Balajee *et al.*, 2006), foi demonstrado que dentre isolados fenotipicamente identificados como *A. fumigatus*, estavam vários isolados de *A. udagawae* (*Neosartorya udagawae*). Vinh *et al.* (2009) relatam que *A. udagawae* assemelha-se morfológicamente e pela produção de gliotoxina a *A. fumigatus* e têm se destacado como espécie emergente causando aspergilose invasiva, mas exibe um comportamento característico de crescimento, sensibilidade a antifúngicos e virulência em cobaias com doença granulomatosa crônica (DGC).

Aspergillus udagawae, contudo, apresenta variações quanto ao tempo de esporulação e esta mesma variação foi encontrada também em isolados de *A. fumigatus*, o que inviabiliza o estabelecimento desta característica como critério de identificação. É plausível que essas diferenças possam explicar o padrão distinto de desenvolvimento da doença que foi observado em casos clínicos (Balajee *et al.*, 2006; Vinh *et al.*, 2009).

A demarcação correta da espécie é importante do ponto de vista da taxonomia, mas as diferenças nos perfis de suscetibilidade também podem indicar relevância clínica (Balajee *et al.*, 2005; Balajee *et al.*, 2006; Staab *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2011; Soleiro *et al.*, 2013).

A integração criteriosa dos métodos de identificação moleculares com fenotipagem clássica disponíveis poderia oferecer uma identificação mais precisa das espécies de *Aspergillus* e adaptação mais apropriada das terapias antifúngicas. O mais aceito atualmente é que as diversas técnicas utilizadas para identificação de *Aspergillus* devem ser usadas em conjunto, para obter uma maior precisão na identificação da espécie (Balajee *et al.*, 2006; Mirhendi *et al.*, 2007; Samsom *et al.*, 2007a).

A identificação rápida e precisa de espécies de *Aspergillus* é necessária para gestão bem sucedida de infecções e para fins epidemiológicos. As estratégias eficazes de prevenção de aspergilose podem ser reforçadas por uma melhor compreensão das fontes ambientais e as rotas de infecção de cepas de *Aspergillus* envolvidas nas infecções. A inalação de esporos do ar para dentro dos pulmões é a rota mais provável de infecção,

alternativamente, esporos aerossolizados ou fluviais de *Aspergillus* podem ser uma fonte potencial de infecção (Lasker, 2002; Mirhendi *et al.*, 2007).

Investigações epidemiológicas seriam facilitadas por um confiável, simples e rápido sistema de identificação, a fim de resolver questões clinicamente relevantes sobre a origem dos surtos e as cepas envolvidas, auxiliando a desenvolver diretrizes melhoradas para o doente e determinar a existência e frequência de cepas patogênicas (Lasker, 2002; Mirhendi *et al.*, 2007). Vários métodos moleculares foram aplicados para a avaliação da epidemiologia genética de espécies de *Aspergillus*. Resumidamente, estes métodos de tipagem molecular incluem o uso de enzimas de restrição, análise de RFLP e análise de marcadores ISSR (*Inter simple sequence repeat*) (Lasker, 2002).

Microsatélites, sequências simples repetidas (*Simple Sequence Repeats* - SSR) ou sequências curtas repetidas (*Short tandem repeats* - STR) são sequências repetitivas curtas de pares de bases de DNA, geralmente compostas de 1 a 4 nucleotídeos, curtos (até 10 pb), e estão abundantemente presentes nos genomas da maioria dos organismos superiores e, em menor medida em vários genomas de procariotos. Distribuem-se ao acaso, formando *loci* genéticos muito mais polimórficos do que os *loci* hiperpermeáveis constituídos por minissatélites. Diferentes isolados podem ser distinguidos uns dos outros com base nas diferenças de SSR, e estes perfis podem ser facilmente comparados uns aos outros (De Valk *et al.*, 2008).

A tipagem molecular é essencialmente usada para identificar isolados epidemiologicamente relacionados, distinguir entre isolados não relacionados de uma determinada espécie, monitorar a disseminação de isolados microbianos específicos e estudar os aspectos genéticos evolutivos e da população de um organismo (Klaassen *et al.*, 2009).

Devido à crescente incidência de infecções fúngicas, métodos de tipagem molecular de isolados fúngicos são cada vez mais utilizados. Estes métodos podem ser empregados para estudar a propagação e a dinâmica populacional de fungos em conformações clínica e ambiental, em níveis que vão desde um único hospedeiro ou em ecossistemas em larga escala. A relação epidemiológica entre isolados clínicos e ambientais pode ser analisada, como a presença de uma fonte ambiental gerando um conjunto de infecções. A compreensão desta dinâmica pode conduzir à criação de procedimentos para controle de infecção mais eficientes (Vanhee *et al.*, 2010).

A técnica de ISSR oferece uma abordagem alternativa para a obtenção de padrões discriminatórios de DNA amplificado. Utilizando um único iniciador de PCR concebido a partir de di, tri, tetra ou penta-nucleotídeos sequenciais repetidos com uma sequência aleatória de ancoragem de 1 a 3 nucleotídeos, o ISSR é uma metodologia rápida e confiável, que aliada às técnicas de identificação clássicas, promove com eficiência a caracterização dos isolados. ISSR é uma técnica de tipagem molecular apropriada para o estudo da diversidade genética e estrutura populacional de uma larga variedade de organismos, incluindo os fungos (Batista *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013).

Para determinar o genótipo de 116 isolados clínicos de *A. fumigatus* obtidos a partir de três unidades de saúde, Araújo *et al.* (2009) utilizaram um conjunto de oito marcadores MC1, MC2, MC5, MC3, MC6a, MC6b, MC7 e MC8, desenhados a partir de regiões microsatélite de sequências conhecidas de *A. fumigatus*. A comparação dos grupos de cepas de diferentes centros de saúde (dois hospitais universitários e um hospital oncológico), utilizando o teste de ANOVA, mostrou que não houveram diferenças significativas entre os grupos e que 99,6% da variação genotípica foi intrapopulacional.

Avaliando a diversidade genética entre 55 isolados de *A. fumigatus* obtidos de seis investigações diferentes de surtos, Balajee *et al.* (2008) aplicou um método que emprega um conjunto de 9 *loci* microsatélites em PCRs multiplex, chamado de ensaio STRAf (Short tandem repeat of *Aspergillus fumigatus*) descrito para *fingerprinting* de isolados de *A. fumigatus*. O estudo demonstrou que os resultados do ensaio STRAf foram similares a resultados anteriores obtidos por outros métodos de genotipagem, identificando que alguns surtos podem ser atribuídos a uma fonte comum de exposição, enquanto que outros surtos foram provenientes de várias fontes, devido aos vários genótipos independentes identificados.

Batista *et al.* (2008) relataram alta diversidade genética utilizando marcadores moleculares ISSR (GACA)₄ e (GTG)₅, na avaliação de 25 isolados clínicos e ambientais de *A. flavus* e espécies relacionadas, e que a utilização do marcador (GACA)₄ originou maior diversidade em relação ao (GTG)₅, embora este último tenha mostrado um perfil de bandas característico para a espécie.

Hadrich *et al.* (2010) avaliaram a diversidade genética através de marcadores moleculares específicos entre 63 cepas de *A. flavus* isoladas de pacientes e do ambiente hospitalar, em unidade hematológica, relatando heterogeneidade genética, em que cada um dos isolados de um paciente e do ambiente hospitalar tinha genótipos diferentes,

destacando ainda que em dois pacientes com aspergilose invasiva, o mesmo genótipo foi encontrado em amostras clínicas e ambientais, indicando colonização e infecção adquirida no hospital.

Rudramurthy *et al.* (2011) realizaram uma tipagem de 162 isolados clínicos de *A. flavus*, utilizando nove marcadores microssatélites selecionados a partir do genoma de *A. flavus*. Destes, treze amostras eram uma mistura de diferentes genótipos, e dos 149 isolados puros, 124 genótipos diferentes puderam ser reconhecidos, demonstrando grande diversidade genotípica em isolados clínicos de *A. flavus*, ressaltando que microssatélites são excelentes alvos para tipagem para discriminar entre isolados de *A. flavus* provenientes de diferentes substratos.

Em um estudo de variabilidade genética utilizando 98 isolados de *A. flavus* de diferentes regiões dos Estados Unidos, Wang *et al.* (2012), constataram mais de 75% de variabilidade entre os isolados testados e a formação de seis grupos sem associações diretas entre espécies hospedeiras, região geográfica ou produção de aflatoxina.

Zhang *et al.* (2013) reiteram que a técnica ISSR tem sido amplamente utilizada em estudos de diversidade e estrutura genética populacional, identificação de germoplasma e discriminação de espécies. Após analisarem a diversidade genética entre 24 cepas de *A. flavus* isoladas de solo de plantações de amendoins utilizando os marcadores UBC 809, UBC 817, UBC 834, UBC 895, UBC e 899, os quais agruparam os isolados em cinco grupos, a capacidade dos marcadores para separar todas as estirpes demonstraram a viabilidade do uso dos perfis de ISSR para caracterizar a diversidade genética de *A. flavus*.

3.6. Produção de melanina em espécies de *Aspergillus*

Dos pigmentos fúngicos, a melanina é a mais estudada, sendo este o nome genérico dos pigmentos marrom-escuros ou negros produzidos não exclusivamente por fungos, mas por organismos de todos os reinos biológicos. São polímeros amorfos de alto peso molecular, hidrofóbicos, insolúveis em substâncias orgânicas, de carga negativa, formados por polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou compostos indólicos com geração de radicais livres e atividade sequestradora, resistentes à degradação por ácidos e suscetíveis à degradação por bases fortes. Foi demonstrado que podem ter um papel protetor em fungos patogênicos tanto humanos quanto vegetais, incluindo *Cryptococcus neoformans*, *Wangiella dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Aspergillus*

fumigatus, contra defesas do hospedeiro (Nosanchuk; Casadevall, 2006; Baker, 2008; Jorgensen *et al.*, 2011).

A síntese de melanina tem sido associada à virulência de uma variedade de microrganismos patogênicos. Acredita-se que a melanina contribui para a patogenicidade, reduzindo a suscetibilidade de um patógeno aos mecanismos antimicrobianos nos hospedeiros e influenciando a resposta imunológica do hospedeiro à infecção. Consequentemente, a melanina e suas vias de síntese são alvos potenciais para a pesquisa de antimicrobianos. Curiosamente, as propriedades de ligação de drogas tanto de hospedeiros quanto de melaninas microbianas poderiam influenciar o resultado da terapia antimicrobiana (Nosanchuk; Casadevall, 2006; Heinekamp *et al.*, 2012).

Dois tipos diferentes de melanina são encontrados nos fungos patogênicos humanos: dihidroxinaftaleno (DHN) melanina e eumelanina. DHN-melanina é biosintetizada usando uma enzima poliketide sintase (PKS) para ciclar o precursor malonil-CoA e por fim agregar um polímero usando uma enzima lacase. Eumelanina é biosintetizada utilizando precursores difenólicos, tais como 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) agregados com uma enzima lacase (fenoloxidase) (Garvey; Keller, 2010; Jorgensen *et al.*, 2011).

Nos mamíferos, a síntese de melanina é catalisada por uma tirosinase. Em contraste, os microrganismos geralmente sintetizam melanina através de várias fenoloxidasas (como tirosinases, lacases ou catacolasas) e/ou pela via de poliketideo sintase (PKS). Melaninas geradas a partir de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) por fenoloxidasas são referidos como eumelaninas, que são geralmente negras ou castanhas. Melaninas amarelas ou avermelhadas são chamados feomelaninas e incorporam cisteína com DOPA. Melaninas acastanhadas derivadas do ácido homogentísico por tirosinases são chamados piomelaninas. Melaninas formadas a partir de acetato através da via de poliketide sintase (PKS) são normalmente negras ou castanhas e são referidas como dihidroxinaftaleno (DHN) melaninas (Nosanchuk; Casadevall, 2006).

Youngchim *et al.*, (2004) descrevem um método baseado em tratamentos com enzimas proteolíticas e glicolíticas, agente desnaturante e ácido concentrado em alta temperatura para obter melanina a partir de conídios de *A. fumigatus*, confirmada por análise de espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR) e utiliza estas partículas melanizadas para produção de anticorpos monoclonais reativos para estudo da melanização *in vitro* e durante a infecção.

Pal *et al.* (2014) investigaram a quantidade e tipo de melanina em 20 isolados de diferentes espécies de *Aspergillus*: *A. niger* (n=3), *A. flavus* (n=5), *A. tamaritii* (n=3), *A. terreus* (n=3), *A. tubingensis* (n=3) e *A. sydowii* (n=3), pela extração de melanina a partir do filtrado da cultura e a partir da biomassa fúngica, seguido de análise qualitativa e quantitativa do pigmento melanina. As análises dos espectros de raios ultravioleta (UV), infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), e espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR) confirmaram a presença de melanina. A maior quantidade de melanina em ambos os métodos de extração foi encontrada em *A. niger* e *A. tamaritii*, respectivamente, o que indica que a quantidade e tipo de melanina produzida por isolados de *Aspergillus* diferem de espécie para espécie.

Aspergillus fumigatus produz melanina pela via DHN, enquanto que em *A. niger* e *A. flavus* foi demonstrado que a biossíntese de melanina é pela via DOPA, através da adição de inibidores de DOPA ao meio de cultura (Pal *et al.*, 2014).

Em fungos patógenos humanos, foi comprovado que na natureza a melanina exerce uma barreira de proteção contra agentes oxidantes, temperaturas extremas, radiação ultravioleta (UV), metais pesados e mantém a integridade do genoma das células fúngicas. No contexto de infecção, foi demonstrada a resistência a mudanças de osmolaridade, variações de temperatura, fagocitose, reações de estresse oxidativo, lise celular e resistência a antimicrobianos (Nosanchuk; Casadevall, 2003; Hohl; Feldmesser, 2007; Urán; Cano, 2008).

O reconhecimento do patógeno e a subsequente resposta imunológica do hospedeiro têm sido atribuídos aos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), sobre as células do sistema imunológico do hospedeiro. Estes receptores reconhecem estruturas conservadas no fungo invasor chamadas padrões moleculares associadas a patógenos (PAMPs). No entanto, a capacidade imunomoduladora da melanina em *Aspergillus* ainda necessita ser esclarecida (Chai *et al.*, 2010).

Sendo a melanina localizada na superfície exterior de conídios e, portanto, em contato com o meio externo e o sistema imunológico do hospedeiro, Chai *et al.* (2010) investigaram o papel da melanina na modulação da resposta do hospedeiro à *A. fumigatus*, concluindo que a camada de melanina desempenha um papel importante na atenuação da resposta imunológica do hospedeiro aos conídios de *A. fumigatus*, mascarando fisicamente os efeitos estimuladores de PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos) como β -

glucana e manana localizados na superfície dos conídios, além de constatar que conídios albinos induzem mais significativamente citocinas inflamatórias que conídios de cepas selvagens.

Em adição às suas outras funções conhecidas de proteção contra a ação de fagócitos do hospedeiro e limitando os danos pelo sistema do complemento, a melanina pode ter um papel adicional como um modulador importante da resposta de citocinas aos conídios de *A. fumigatus* (Tsai *et al.*, 1998; Jahn *et al.*, 2000, Langfelder *et al.*, 2003; Chai *et al.*, 2010).

A perda da enzima envolvida na biossíntese de pigmentos (PKS) origina cepas com conídios lisos albinos. Em experimentos *in vivo*, as cepas albinas induzem os neutrófilos a secretarem maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) do que o tipo selvagem e passam por fagocitose e trafegam aos fagolisossomos mais prontamente. Em um modelo murino de aspergilose invasiva, cepas desprovidas do gene *alb1*, que dirige a síntese da enzima PKS mostraram virulência reduzida em comparação a cepas de tipo selvagem (Youngchim *et al.*, 2004; Brakhage; Liebmman, 2005; Sugui *et al.*, 2007a; Chai *et al.*, 2010).

Os conídios de *A. fumigatus* que os humanos inalam do ar tem o pigmento verde azulado sobre sua superfície identificado como DHN-melanina. Esta camada de melanina desaparece quando os conídios intumescem para iniciar a germinação dentro do organismo, e uma vez que as células hospedeiras interagem primeiro com os conídios inalados, é interessante elucidar o papel da melanina na patobiologia de *A. fumigatus* (Tsai *et al.*, 1998; Chai *et al.*, 2010).

3.7. Produção de gliotoxina por espécies de *Aspergillus*

Um possível mecanismo de evasão do fungo é a supressão de funções imunológicas por ação de micotoxinas, que são metabólitos fúngicos secundários (Garvey; Keller, 2010).

Metabólitos secundários são muitas vezes bioativos, e são produzidos como famílias de compostos ligados a fases restritas do ciclo de vida dos fungos, com produção muitas vezes correlacionadas a um estágio específico de diferenciação morfológica. Organismos produtores podem crescer sem sintetizar estes metabólitos, e ter distribuição

taxonômica restrita a apenas um pequeno grupo de organismos (Keller *et al.*, 2005; Wiemann *et al.*, 2014).

As classes mais bem caracterizadas de toxinas incluem aflatoxinas, peptídeos cíclicos, alcalóides e sesquiterpenóides. Outra classe, as epipolítiodioxopiperazinas (ETPs), é caracterizada pela presença de uma ponte dissulfeto interna. Destas, uma das mais tóxicas é a gliotoxina, que é produzida durante o crescimento de hifas. O anel de dicetopiperazina é derivado de um dipeptídeo cíclico e sua ponte de enxofre imprime toda a toxicidade conhecida destas moléculas, alvo de muitas investigações sobre a sua estrutura e atividade (Gardiner *et al.*, 2005; Kupfahl *et al.*, 2008; Cerqueira *et al.*, 2014)

In vitro, a gliotoxina regula um largo espectro de efeitos supressivos sobre diferentes tipos de células do sistema imunológico, tais como: inibição da função de leucócitos polimorfonucleares, 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, além de ser facilmente detectada durante a infecção experimental, com apenas 24 horas de cultivo e em soros de pacientes com aspergilose (Nishida *et al.*, 2005; Kupfahl *et al.*, 2006; Hohl; Feldmesser, 2007; Kwon-Chung; Sugui, 2009; Speth *et al.*, 2011; Scharf *et al.*, 2012; Kwon-Chung; Sugui, 2013; Cerqueira *et al.*, 2014).

Cerqueira *et al.* (2014), testaram um novo método de quantificação de gliotoxina por HPLC-MS/MS, considerado reprodutível, rápido e seletivo para a quantificação de gliotoxina em soro humano. A detecção de gliotoxina por este método pode facilitar o diagnóstico precoce de aspergilose invasiva. Com base nos resultados obtidos, é evidente que a detecção de gliotoxina por um método sensível e preciso pode ser uma opção para o diagnóstico de aspergilose invasiva.

A produção de gliotoxina em culturas de *A. fumigatus* foi observada primeiro por Menzel *et al.* em 1944, como um contaminante na preparação de experimento para produção de outro metabólito secundário, a fumigacina. Acredita-se que estes efeitos são resultado de diferentes mecanismos, sendo o mais importante, provavelmente, a inibição do fator de transcrição NF- κ B, o principal regulador da transcrição do gene de citocinas inflamatórias. Uma vez que este fator é uma parte integral da resposta imunológica e inflamatória e controla a expressão de algumas citocinas, a sua inibição pode contribuir

para as propriedades imunossupressoras das ETPs (Gardiner *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005b).

Poucos dados estão disponíveis sobre a produção da gliotoxina entre os diferentes gêneros dos fungos. Sabe-se que a gliotoxina 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 gliotoxina (Gardiner *et al.*, 2005).

Entre as várias espécies do gênero *Aspergillus*, apenas a produção de gliotoxina por *A. fumigatus* foi estudada mais profundamente. A frequência média da produção de gliotoxina 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 *et al.*, 2005; Kupfahl *et al.*, 2008; Scharf *et al.*, 2012). Para *A. flavus* e para *A. niger* provenientes de diversos espécimes clínicos, a produção de gliotoxina varia de 4% a 13% e 56% a 75%, respectivamente (Kupfahl *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2005b).

Em estudos que citam a frequência de fungos produtores desta toxina isolados a partir de fonte ambiental e de espécimes clínicos, Kupfahl *et al.* (2008) avaliaram a produção de gliotoxina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria de massa em isolados de *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus* e *A. niger* em sobrenadantes de cultura 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 gliotoxina. Entre as outras espécies de *Aspergillus* testadas, uma porcentagem significativamente menor de isolados produziu gliotoxina: *A. terreus* (n=27), *A. niger* (n=16), e *A. flavus* (n=15) produziram a gliotoxina a uma frequência de 37%, 56%, e 13%, respectivamente.

Santos *et al.* (2003) relataram que apenas 11% das cepas de *A. fumigatus* isoladas de silos na ilha Terceira, nos Açores foram produtores de gliotoxina. 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 gliotoxina em comparação com 75% de cepas de *A. niger* (n = 9) e 25% de *A. terreus* (n = 27), respectivamente. Apenas 4% dos isolados de *A. flavus* (n = 18) produziram gliotoxina.

Além disso, as concentrações de gliotoxina produzidos pelos isolados de *A. fumigatus* foram significativamente maiores do que os de outras espécies.

Uma possível interpretação desta discrepância entre os resultados é que a produção de gliotoxina atua 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 gliotoxina com frequência retarda significativamente o movimento ciliar e também causa dano ao epitélio ciliado respiratório humano (Hohl; Feldmesser, 2007; Kupfahl *et al.*, 2008).

Em cobaias imunocompetentes, a administração de gliotoxina resulta em um nível de imunossupressão suficiente para tornar os animais suscetíveis à aspergilose invasiva após exposição aos conídios de *A. fumigatus* (Lewis *et al.*, 2005b). Desde que foi possível a detecção da gliotoxina em tecidos pulmonares de cobaias com aspergilose invasiva induzida experimentalmente (Lewis *et al.*, 2005b; Kuhpfal *et al.*, 2006), estes achados sugerem que a função da gliotoxina seria auxiliar na evasão do fungo de células efectoras do sistema imunológico do hospedeiro (Chotirmall *et al.*, 2014). Além disso, a gliotoxina pode ser detectada no soro de pacientes com aspergilose invasiva (Lewis *et al.*, 2005a, Puri *et al.*, 2010), corroborando que a gliotoxina também é produzida na aspergilose invasiva em humanos (Kupfahl *et al.*, 2008; Bugli *et al.*, 2014).

Devido a suas potentes atividades imunossupressora e antimicrobiana, em particular a inibição da farnesil-transferase e geranylgeranyltransferase I, despertou-se o interesse na potencial atividade antitumoral desta toxina. Estudos evidenciam que a gliotoxina inibiu a proliferação de seis linhagens celulares de câncer de mama em culturas celulares (Vigushin *et al.*, 2004). Em estudos aleatórios controlados, utilizando o modelo de carcinoma mamário de rato de N-metil-N-nitrosoureia, a gliotoxina demonstrou pronunciada atividade antitumoral *in vitro* e pouca toxicidade sistêmica quando administrada em animais na concentração de 10 mg/kg por injeção subcutânea por semana, durante 4 semanas em comparação com 10 controles. Doses únicas até 25 mg/kg foram bem toleradas. Estes estudos confirmam que a gliotoxina é um inibidor duplo de farnesil-transferase e geranylgeranyltransferase I com atividade antitumoral acentuada e perfil de toxicidade favorável contra o câncer de mama, *in vitro* e *in vivo* (Vigushin *et al.*, 2004).

Há relatos de que a gliotoxina inibe a angiogênese durante o desenvolvimento da aspergilose invasiva (AI). Em hospedeiros suscetíveis, angioinvasão por *A. fumigatus*

provoca 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. Alguns dos metabólitos secundários sintetizados por *A. fumigatus*, como a gliotoxina, tem se mostrado promissores como agentes anti-cancerígenos, devido à sua potente atividade antiangiogênica, porém, se o efeito desta rede é proangiogênico ou antiangiogênico ainda não foi esclarecido (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 *IaeA*, regulador global do metabolismo secundário, aboliu a atividade antiangiogênica de *A. fumigatus*, indicando que este processo é mediado através da produção de metabólitos secundários, particularmente, a gliotoxina.

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

Em estudos anteriores, foi possível a interrupção da enzima peptídeo sintase não ribossomal codificada pelo gene *gliP* dentro do provável *cluster* biossintético da gliotoxina, através da deleção do gene. As estirpes nas quais o gene *gliP* foi deletado (Δ *gliP*) falharam em produzir gliotoxina. Dois trabalhos não relataram diferença na sobrevivência das cobaias após a infecção com cepas Δ *gliP*, em cobaias neutropênicas (Cramer *et al.*, 2006; Kupfahl *et al.*, 2006). Contudo, um terceiro grupo de pesquisa demonstrou a redução da virulência de cepas Δ *gliP* em um modelo de aspergilose pulmonar de baixo inóculo, em cobaias tratadas com corticosteróides. Estes dados sugerem que a gliotoxina 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 (Sugui *et al.*, 2007B).

Ainda não está esclarecida em qual etapa da infecção a gliotoxina atua *in vivo*, mas 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). Novos estudos são necessários para melhor definição do papel da gliotoxina na patogênese da aspergilose invasiva (Lewis *et al.*, 2005a,b).

3.8. Estabelecimento de modelo animal em espécies de *Aspergillus*

Modelos animais de aspergilose pulmonar invasiva são inestimáveis para a avaliação de novas terapias e testes diagnósticos, estudo da resposta imunológica do hospedeiro, vias de transmissão bem como para o estudo da patogênese da doença. A escolha do animal é extremamente importante e deve reproduzir o quadro clínico da doença tão bem quanto possível. Uma grande variedade destes modelos tem sido descrita em camundongos, ratos, coelhos e porquinhos da índia, incluindo infecções intravenosa, intranasal, intratraqueal, e por inalação (Sheppard *et al.*, 2004; Clemons; Stevens, 2005; Stephens-Romero *et al.*, 2005; Vallor *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010).

Dentre os métodos de infecção, a instilação intranasal é um procedimento largamente utilizado para testes farmacêuticos, vacinas em teste, ou introdução de agentes infecciosos no trato respiratório de camundongos em pesquisa, que é vantajoso por ser de fácil execução e não traumático para o animal (Miller *et al.*, 2012).

Persiste, no entanto, a dificuldade de estabelecer padrões reprodutíveis de aspergilose invasiva. A disponibilidade de um modelo normalizado seria útil por proporcionar uma referência para a avaliação de novas estratégias de diagnóstico e terapêuticas por meio de estudos conduzidos em laboratórios separados geograficamente (Sheppard *et al.*, 2004; Patterson, 2005).

Os modelos animais têm sido utilizados para avaliar novas propostas de testes diagnósticos e o tratamento da aspergilose invasiva, e também para avaliar a patogenicidade e virulência características destes fungos. Atualmente, extensos esforços estão em curso para aumentar significativamente a informação genômica sobre *Aspergillus*, e como resultado, existe um grande potencial para identificação de novas estratégias de diagnóstico e terapêutica criticamente necessários para a aspergilose, cujo curso muitas vezes é letal (Patterson, 2005; Sugui *et al.*, 2008; Schumann *et al.*, 2010).

Infecção experimental tem sido útil para avaliar a patogenia e virulência de *Aspergillus* e tem auxiliado significativamente o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e modalidades terapêuticas, as quais derivam do sequenciamento do genoma de *Aspergillus* (Patterson, 2005; Gravelat *et al.*, 2008).

A utilidade e reprodutibilidade de modelos de infecção com aerossóis de *A. fumigatus* para aspergilose pulmonar vêm sendo avaliada há alguns anos. Os modelos animais de aspergilose têm sido amplamente utilizados para o estudo de vários aspectos da

patogênese, resposta inata do hospedeiro, transmissão de doenças adquiridas e terapia (Clemons, Stevens, 2005; Muhammed *et al.*, 2012).

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 realizados para simular as doenças humanas têm contado com modelos utilizando espécies de animais comuns de laboratório. Modelos de porquinhos-da Índia foram usados principalmente em estudos terapêuticos de aspergilose pulmonar invasiva (API). Coelhos foram utilizados para estudar a API e aspergilose disseminada, assim como ceratite fúngica. Modelos de aspergilose utilizando roedores, particularmente ratos, predominam como 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 rotineiramente animais imunocompetentes e imunossuprimidos (Clemons, Stevens, 2005).

Estes modelos têm sido utilizados para determinar a eficácia de terapêuticas experimentais, comparar a virulência de diferentes isolados de *Aspergillus*, definir genes envolvidos na virulência e susceptibilidade à infecção. Tais modelos têm sido fundamentais para o avanço da terapia antifúngica e compreensão da patogênese e resistência do hospedeiro (Clemons, Stevens, 2005; Muhammed *et al.*, 2012).

Surpreendentemente, pouco se sabe sobre o ciclo de desenvolvimento de *A. fumigatus in vivo*. *In vitro*, os conídios de *A. fumigatus* germinam para produzir hifas, as quais são inicialmente incapazes de produzir estruturas reprodutivas assexuadas em resposta a estímulos. Depois de um determinado período de tempo após a germinação, estas hifas se tornam capazes de produzir estruturas de reprodução assexuada. Esta mudança de um estado em que as hifas não podem iniciar a reprodução assexuada de um em que elas podem é denominada aquisição da capacidade de desenvolvimento. O tempo de aquisição de competências de desenvolvimento é afetado pela temperatura, mas é independente do estado nutricional (Gravelat *et al.*, 2008).

Uma das questões a ser avaliada quando do planejamento do modelo experimental, 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 aspergilose pulmonar invasiva em camundongos infectados com o mesmo inóculo e em estado de imunidade modificada por tratamento com corticosteróide ou um agente

quimioterápico, pelo fato de que 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 aspergilose pulmonar invasiva. Neste trabalho, 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.

Xiao-Hui *et al.* (2011) em experimento com camundongos da linhagem Balb/C imunossuprimidos com ciclofosfamida verificaram que todos os animais mostraram letargia, pelagem sem brilho, a relutância em atividade ambiental, piloereção e redução da ingestão de alimentos e água no dia 1 após a primeira injeção de ciclofosfamida, sendo lentamente restaurados, e determinou que para estes animais, a dose de reforço pode reforçar a imunodepressão. A imunossupressão ideal nestes animais pode ser induzida por duas injeções intraperitoneais de ciclofosfamida a 150 mg/kg, sendo passível de estabelecer um modelo animal para estudos com fungos oportunistas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das culturas

Foram utilizados 43 isolados de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, de diferentes substratos, mantidos na Coleção de Culturas Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob óleo mineral, e 14 isolados a serem depositados nesta coleção, sendo de 23 isolados de *A. fumigatus* (tabela 1), 16 isolados de *A. flavus* (tabela 2) e 18, isolados de *A. niger* (tabela 3), no total de 57 isolados. As espécies foram autenticadas pela equipe da Micoteca URM com base nas características macro e micromorfológicas, com auxílio de literatura especializada, e mantidos em tubos de ensaio contendo meio Ágar Czapeck em temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$).

4.2. Estudo da variabilidade genética

4.2.1. Obtenção do micélio e extração do DNA

Os isolados foram transferidos para frascos tipo Erlenmeyer (250ml) contendo 50ml de meio Czapeck líquido e incubados em temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) para o crescimento micelial durante 5 dias. A extração de DNA genômico a partir do micélio dos isolados foi realizada conforme a metodologia descrita por Góes-Neto *et al.* (2005) adaptada. O método de extração direta foi baseado em *bead-beating* na velocidade de agitação de 5.0m/s, durante 60 segundos, em microtubo contendo 800 μl de tampão CTAB a 2%, pH 8.0 (previamente aquecido em 65°C) e aproximadamente 65mg de micélio e levado a seguir ao aparelho Fastprep® (MP Biomedicals). O microtubo foi incubado a 65°C por 1 hora e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro microtubo ao qual foram adicionados 650 μl de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 13.000 rpm. A fase aquosa recuperada foi transferida para outro microtubo e acrescido de isopropanol absoluto, à temperatura de -20°C , na mesma proporção do volume recuperado. Procedeu-se a incubação a -20°C , por 60 minutos para precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, descartando posteriormente o sobrenadante. Para a lavagem do sedimento, foram adicionados 1ml de etanol 70% ao microtubo e centrifugado a 13.000 rpm, por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o tubo colocado em estufa a 37°C para completa evaporação do álcool e então adicionados 50 μl de tampão Tris-EDTA (pH 8.0).

4.2.2. Análise da variabilidade genética dos isolados

As reações de PCR para análise da variabilidade genética dos isolados de *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* foram realizadas utilizando os marcadores ISSR (GACA)₄ (GACAGACAGACAGACA) e (GTG)₅ (GTGGTGGTGGTGGTG), de acordo com Batista *et al.* (2008). As reações de amplificação foram feitas em volume final de 25µL nas seguintes condições: Tampão (Tris– HCl 20mM pH 8.4; KCl 50mM), MgCl₂ 0.75mM, dNTP 0.25mM, 0.25mM do *primer*, 0.4U de *Taq* DNA polimerase (Operon Technologies CA) e 25 ng de DNA. As reações de amplificação foram realizadas utilizando o termociclador Techne TC-512 com a seguinte programação: uma etapa de desnaturação inicial a 93°C por 5 minutos, 40 ciclos de 20 segundos a 93°C, 45 segundos a 55°C e 90 segundos a 72°C, seguidos por uma extensão final de 6 minutos a 72°C. Os produtos amplificados e o DNA *ladder* de 100Kb plus (Invitrogen Life Technologies) foram corados com *GelGreen*TM, separados por eletroforese em gel de agarose 1.5 %, a 3V.cm⁻¹ em tampão de corrida TAE 1X (pH 8.0). Após a corrida eletroforética, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado.

3.2.3. Análise estatística

Os dados obtidos das amplificações com os marcadores (GTG)₅ e (GACA)₄ foram analisados pelo programa *Numerical Taxonomy System of Multivariaty Programs* – NTSYS-PC (18), e gerados dendrogramas pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetical Average*).

Tabela 1. Isolados de *A. fumigatus* de acordo com a origem do substrato/hospedeiro.

Isolado	URM/Número de isolamento	Substrato/Hospedeiro
1	3372 URM	Rizosfera
2	3550 URM	Aveia
3	3559 URM	Aveia
4	3812 URM	Polpa de maracujá
5	5404 URM	Água de viveiro de camarão
6	5410 URM	Água de viveiro de camarão
7	5492 URM	Farinha de amendoim
8	5698 URM	Torta de mamona industrial
9	5943 URM	Solo de mata atlântica
10	5992 URM	Solo de caatinga
11	6200 URM	Fragmento de pulmão
12	6327 URM	Secreção conduto auditivo externo
13	08-A	Escarro
14	6562	LBA
15	69M	LBA
16	75M	Escarro
17	6559 URM	Fragmento de pulmão
18	120M	Escarro
19	6560 URM	Escarro
20	5049 URM	Fragmento de aorta abdominal
21	6151 URM	Solo de mata atlântica
22	4320 URM	Solo de mineradora
23	6573 URM	LBA

LBA: Lavado bronco-alveolar

Tabela 2. Isolados de *A. flavus* de acordo com a origem do substrato/hospedeiro.

Isolado	URM/Número de Isolamento	Substrato/Hospedeiro
24	08-B	Escarro
25	4541 URM	Fubá de Milho
26	4709 URM	Solo
27	5493 URM	Farinha de amendoim
28	5740 URM	Torta de mamona industrial
29	5987 URM	Fragmento de pulmão
30	6313 URM	Escarro
31	6314 URM	Escarro
32	6325 URM	Secreção conduto auditivo externo
33	6315 URM	Escarro
34	6332 URM	Secreção conduto auditivo externo
35	6333 URM	Secreção conduto auditivo externo
36	HC2A	Secreção conduto auditivo externo
37	68B	Solo de caatinga
38	119D	Solo de caatinga
39	72B	Solo de caatinga

Tabela 3. Isolados de *A. niger* de acordo com a origem do substrato/hospedeiro.

Isolado	URM/Número de isolamento	Substrato/Hospedeiro
40	2604 URM	Pulmão de Ave
41	3820 URM	Solo de açude
42	4645 URM	Solo
43	5001 URM	Solo
44	5741 URM	Torta de mamona industrial
45	5838 URM	Torta de mamona industrial
46	5924 URM	Fragmento de Pulmão
47	6316 URM	Escarro
48	6317 URM	Escarro
49	6318 URM	Escarro
50	6795 URM	Secreção conduto auditivo externo
51	6794 URM	Secreção conduto auditivo externo
52	6329 URM	Secreção conduto auditivo externo
53	HC2C	Secreção conduto auditivo externo
54	100B	Solo de caatinga
55	26 ^a	Solo de caatinga
56	6C	Solo de caatinga
57	164D	Solo de caatinga

4.3. Produção e quantificação de partículas de melanina de conídios de *Aspergillus*

A produção de partículas de melanina a partir de conídios de *Aspergillus* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Youngchim *et al.* (2004) modificada, na qual foi acrescido o tween 80 (0,2%) ao tampão. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio Sabouraud dextrose ágar durante 5 dias a 37°C. Após este período, foram adicionados às placas 5ml de tampão salina fosfato (PBS) 0,2M com pH 7,4 acrescido de tween 80 (0,2%) esterilizado, posteriormente os conídios foram retirados delicadamente com alça. A seguir, os conídios foram submetidos a centrifugação a 8000g por 30 minutos e lavados três vezes com tampão PBS com pH 7,4 esterilizado, e lavados com solução de Sorbitol 1,0M e Citrato de sódio 0,1M (pH 5,5). Enzimas de lise de parede celular de *Trichoderma harzianum* Novozyme (Sigma Aldrich) foram adicionadas (10 mg/ml) e os conídios foram incubados *overnight* a 30°C para gerar protoplastos.

Os protoplastos foram coletados por centrifugação e lavados três vezes com tampão PBS esterilizado e incubados em tiocianato de guanidina 4,0M (Sigma Aldrich), *overnight* à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$). As partículas escuras foram recolhidas por centrifugação, lavadas três vezes com tampão PBS (pH 7,4) esterilizado e tratadas com 1,0 mg/ml de proteinase K (Sigma Aldrich) em tampão de reação (10,0 mM Tris, 1,0mM CaCl_2 e 0,5% SDS, pH: 7,8) e incubados a 37°C. As partículas foram lavadas três vezes com tampão PBS (pH 7,4) e tratadas com HCl 6,0M em banho Maria a 100°C por 2 horas.

Após o tratamento com ácido, as partículas de melanina foram coletadas por filtração em papel de filtro quantitativo C40 (faixa branca 125mm) previamente pesado e lavadas exaustivamente com água destilada, a seguir, os papéis de filtro foram secos em estufa a 37°C, pesados, e a concentração de melanina estabelecida de acordo com o peso da massa seca segundo Van de Sande *et al.* (2007). Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas, utilizando os programas Microsoft Excel, o teste de normalidade de Shapiro Wilks e o Teste T de Student independente. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância 0,05% ($p < 0,05$), ou seja um intervalo de confiança de 95%.

Todas as etapas de produção de melanina foram acompanhadas por microscopia ótica, e ao final do processo, após a lavagem das partículas escuras, foram confeccionadas lâminas das partículas em água destilada, para visualização da deposição do pigmento escuro na parede do conídio.

4.4. Análise ultraestrutural

A análise ultraestrutural das partículas de melanina foi realizada por microscopia eletrônica de Varredura (MEV), na Central Analítica do Departamento de Química fundamental (DQF) – UFPE.

Após secagem em estufa, as partículas de melanina foram montadas em *stubs* e metalizados através do bombardeamento com ouro. As micrografias foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura ambiental (MEV), modelo Shimadzu SS-550 com filamento de Tungstênio e com acoplamento para espectrômetro de dispersão de energia (EDS).

4.5. Espectroscopia de Infravermelho (IR)

Após a quantificação das partículas escuras, uma alíquota de conídios melanizados de cada espécie de *Aspergillus* foi selecionada para análise do perfil de melanina. As amostras foram submetidas a secagem em estufa a 100°C e enviadas para análise de Espectroscopia de Infra vermelho (IR), no Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE. Os espectros foram obtidos utilizando o Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (Bruker IFS66), em pastilha de KBr. Os espectros obtidos foram comparados a espectros padrão de melanina produzida por espécies de *Aspergillus* (Gonçalves *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2014).

4.6. Produção de gliotoxina

A produção de gliotoxina foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Kuhpfahl *et al.* (2008) modificada. Os isolados foram cultivados em meio ágar malte a 37°C durante cinco dias. Após esta etapa, foi retirado um bloco de ágar micélio de 5 mm de diâmetro e inoculado em 25ml de meio RPMI 1640 contido em frascos tipo Erlenmeyer a 37°C, sob agitação de 140 rpm, durante 5 dias.

4.6.1. Obtenção dos Extratos Brutos

Ao final do cultivo sob agitação, a fase líquida foi separada do micélio por filtração utilizando papel filtro quantitativo C40 (faixa branca 125mm). À fase líquida obtida foi adicionada 25ml de clorofórmio, 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 ao meio de cultura, utilizando a metodologia de partição líquido-líquido em balão de separação de 250ml, onde 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°C e, em seguida, ressuspensa em 500 µl de acetonitrila, e armazenada a 4°C até a análise em CLAE.

4.6.2. Quantificação de gliotoxina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência (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 diodos (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) foi utilizado para o preparo da solução acidificada. Foi utilizado padrão de gliotoxina pura (Sigma-Aldrich) dissolvida em 1ml de metanol para estabelecimento da curva padrão e curva de calibração.

4.6.3. Análise de gliotoxina produzida por *Aspergillus*

A análise da gliotoxina 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, 150mm x 4,6mm x 5µm, 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). Utilizou-se o seguinte gradiente isocrático 75:25 (Eluente A: Eluente B). Para quantificação da gliotoxina 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. O volume injetado foi de 5µl para amostra padrão e amostras testes. Os cromatogramas foram monitorados em um 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.

4.7. Estabelecimento de aspergilose pulmonar em modelo animal

4.7.1. Animais

O projeto foi submetido a aprovação pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFPE, sob o número 23076.032760/2014-10 (em anexo). Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), com peso entre 30-50g, do sexo masculino, 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 biotério convencional.

Os animais foram mantidos em gaiolas em grupos de seis animais (Figura 1), submetidos ao regime de imunossupressão com ciclofosfamida (150mg/kg), não havendo mortalidade em função da imunossupressão. No dia 4 do experimento, foi colhido sangue periférico de todos os animais para realização de hemograma, que constatou queda dos valores absolutos e relativos de neutrófilos comparados a animais saudáveis, variando de 70% a 90% dos valores de referência. Foi realizada infecção nos camundongos, através de instilação intranasal de um inóculo de 25µl contendo 5×10^5 conídios.

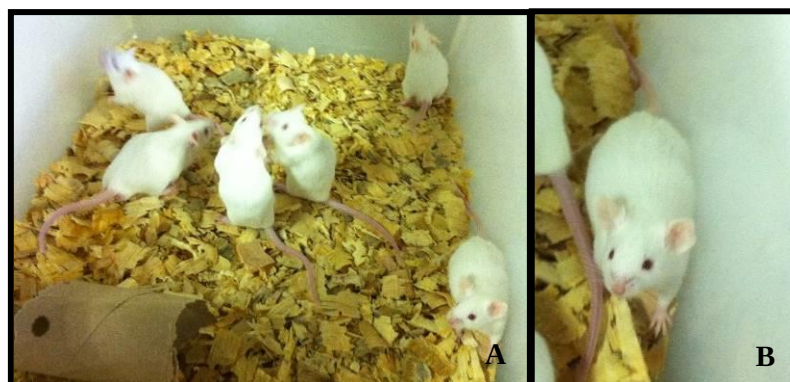


Figura 1. Camundongos Swiss (*Mus musculus*) em gaiola (A e B).

4.7.2. Imunossupressão dos animais

Os animais foram pesados e imunossuprimidos com ciclofosfamida (150mg/kg), no dia 0 e dia 3, e tratados com o antibiótico enrofloxacino (5ml/kg) por via intraperitoneal para prevenir infecções bacterianas. No dia 4 do experimento foi colhido sangue periférico para realização de hemogramas para confirmar a imunossupressão.

4.7.3. Infecção experimental

Sendo *A. fumigatus* a espécie mais relacionada à aspergilose pulmonar invasiva, dois isolados foram selecionados, de acordo com os resultados de quantificação de gliotoxina e origem do substrato, para estabelecimento do modelo de infecção. Os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose contido em placas de Petri por 5 dias a 37°C, e os conídios coletados pela adição de tampão salina fosfato estéril (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 5×10^5 . Foram utilizados 4 grupos de animais: dois grupos de animais imunossuprimidos infectados com fungo, um grupo apenas imunossuprimido e um grupo imunossuprimido inoculado apenas com salina tampão PBS adicionado de 0,2% de Tween 80.

No dia 4 do experimento, os animais foram anestesiados com uma combinação de quetamina (100mg/kg) e xilazina (2,5mg/kg) por via intraperitoneal, e foi administrado um volume de 25µl por instilação intranasal de inóculo contendo 5×10^5 conídios, e a eutanásia por dose letal combinada de quetamina e xilazina (0,25ml 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 meio ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (50mg/l) em duplicata e incubados a temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$) e a 37°C. Para análise anatomopatológica os fragmentos foram preservados em solução de formol a 10% e realizados cortes histológicos (Lacaz *et al.*, 2002).

5. RESULTADOS

5.1. Análise dos perfis de amplificação utilizando o marcador (GACA)₄

Os perfis de amplificação das regiões ISSR, utilizando o marcador (GACA)₄ em 23 isolados de *A. fumigatus*, 16 isolados de *A. flavus* e 18 isolados de *A. niger* estão ilustrados nas figuras de 2 a 7. Foram obtidos padrões de 3 a 7 fragmentos, com peso molecular variando em torno de 600 a 2000 pares de bases. O marcador evidenciou a formação de 3 grupos com 100% de similaridade para *A. fumigatus*, 4 grupos para *A. flavus* e 3 grupos para *A. niger*. Um agrupamento com 100% de similaridade em *A. fumigatus* e três em *A. flavus* foram formados em função da origem, e os demais eram compostos por isolados de origens distintas, indicando certa variabilidade genética.

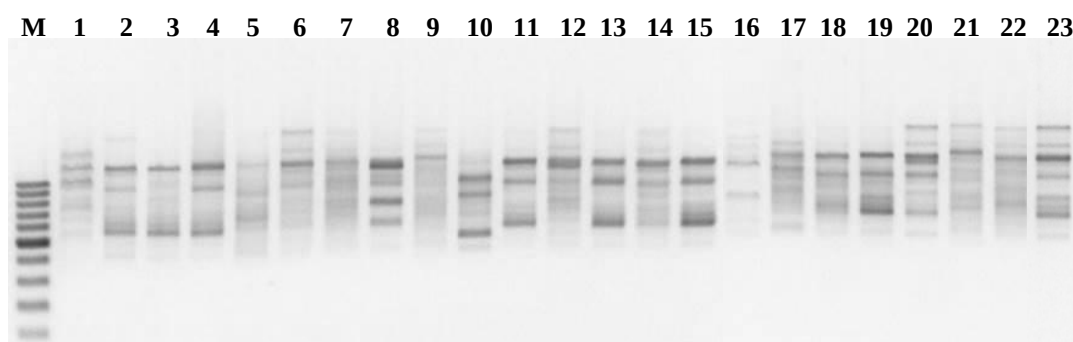


Figura 2. Perfis de amplificação de ISSR de *A. fumigatus* obtidos com o marcador (GACA)₄. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 1-10, 21 e 22: isolados ambientais, pistas 11-20 e 23: isolados clínicos.

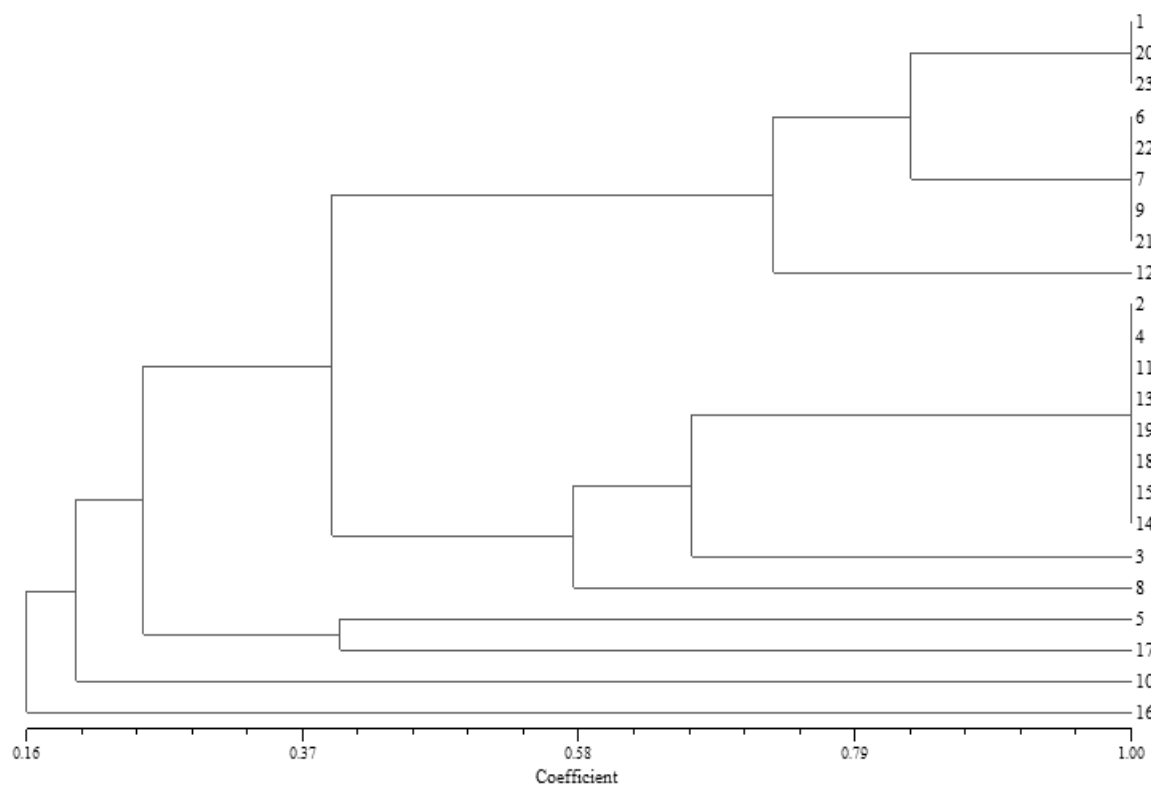


Figura 3. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GACA)₄, de isolados de *A. fumigatus*. Números 1-10, 21 e 22: isolados ambientais, números 11-20 e 23: isolados clínicos.

M 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

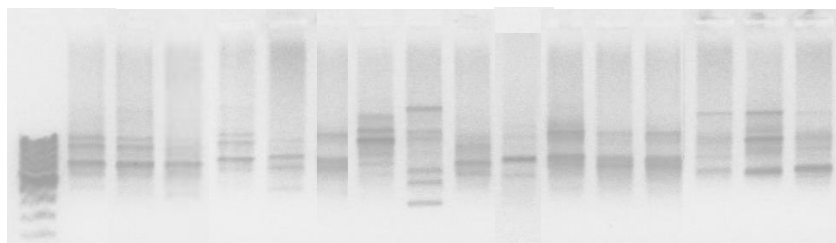


Figura 4. Perfis de amplificação de ISSR obtidos de *A. flavus* com o marcador (GACA)₄. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 24, 29-36: isolados clínicos, pistas 25-28, 37-39: isolados ambientais.

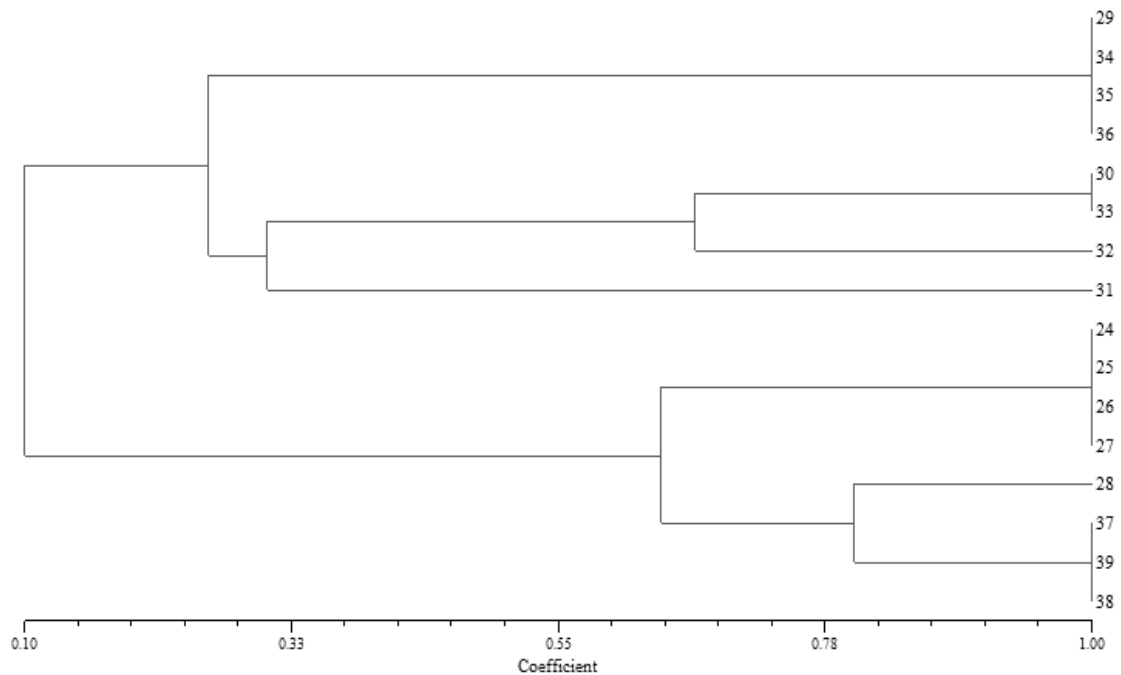


Figura 5. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GACA)₄, obtidos de isolados de *A. flavus*. Números 24, 29-36: isolados clínicos, números 25-28, 37-39: isolados ambientais.

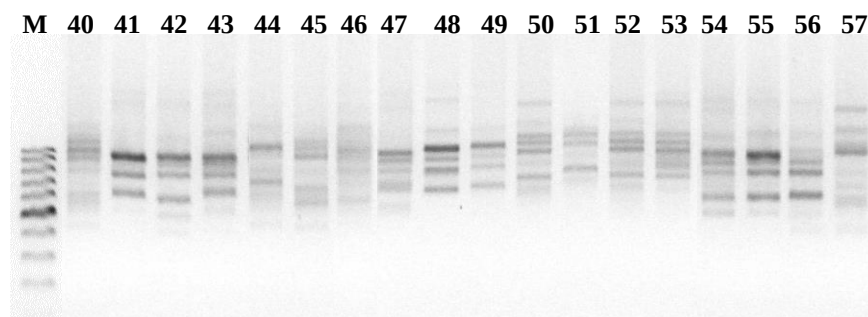


Figura 6. Perfis de amplificação de ISSR obtidos de *A. niger* com o marcador (GACA)₄. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 40, 46-53: isolados clínicos, pistas 41-45, 54-57: isolados ambientais.

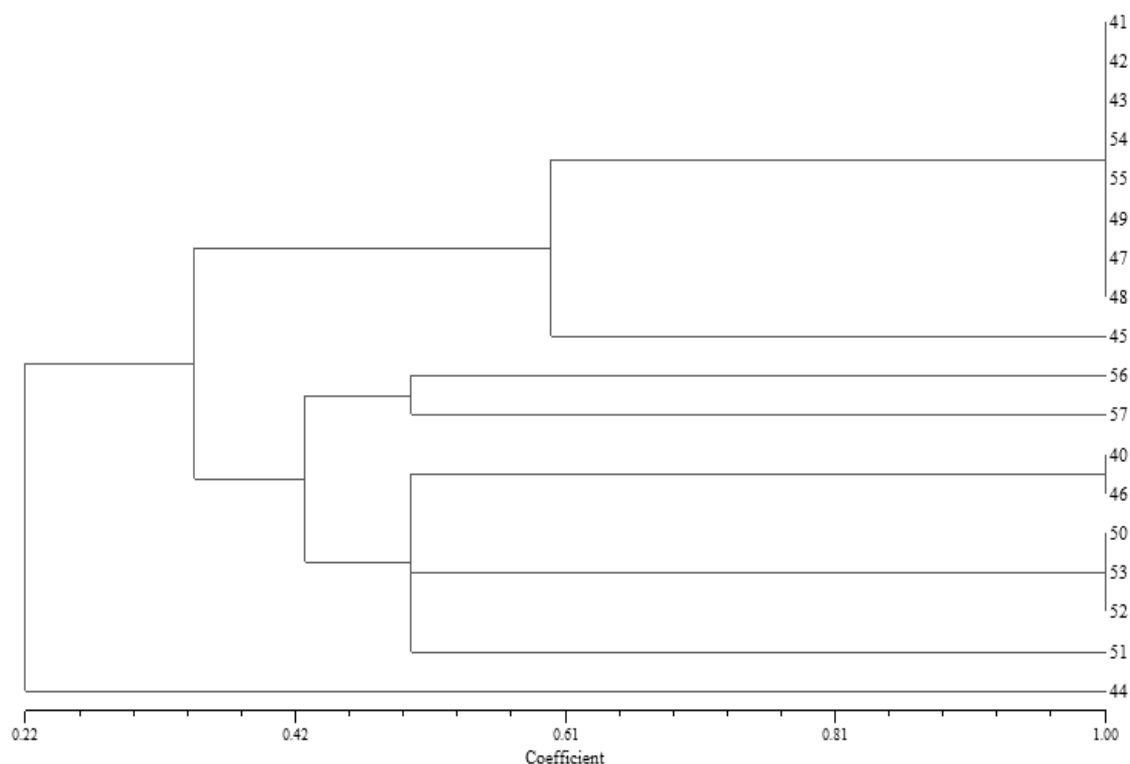


Figura 7. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GACA)₄, obtidos de isolados de *A. niger*. Números 40, 46-53: isolados clínicos, números 41-45, 54-57: isolados ambientais.

5.2. Análise dos perfis de amplificação utilizando o marcador (GTG)₅

Os perfis de amplificação das regiões ISSR, utilizando o marcador (GTG)₅ em 23 isolados de *A. fumigatus*, 16 isolados de *A. flavus* e 18 isolados de *A. niger* estão ilustrados nas figuras 8 a 13. Foram obtidos padrões de 3 a 8 fragmentos, com peso molecular variando em torno de 600 a 2000 pares de bases. O marcador evidenciou a formação de 3 grupos com 100% de similaridade para *A. fumigatus* e *A. flavus* e 6 grupos para *A. niger*. Os agrupamentos com 100% de similaridade para *A. fumigatus* foram formados por perfis de isolados ambientais e clínicos, demonstrando similaridade genética. Todos os agrupamentos com 100% de similaridade em *A. flavus* e um agrupamento em *A. niger* eram compostos apenas de perfis de isolados clínicos ou ambientais, indicando que o marcador foi eficaz para agrupar os isolados pela origem do isolamento.

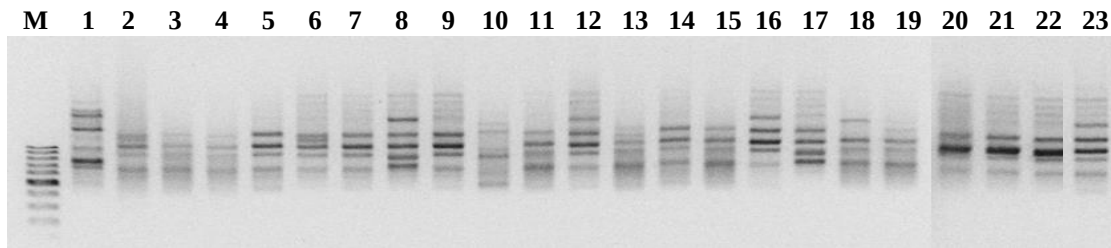


Figura 8. Perfis de amplificação de ISSR de *A. fumigatus* obtidos com o marcador (GTG)₅. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 1-10, 21 e 22: isolados ambientais, pistas 11-20, 23: isolados clínicos.

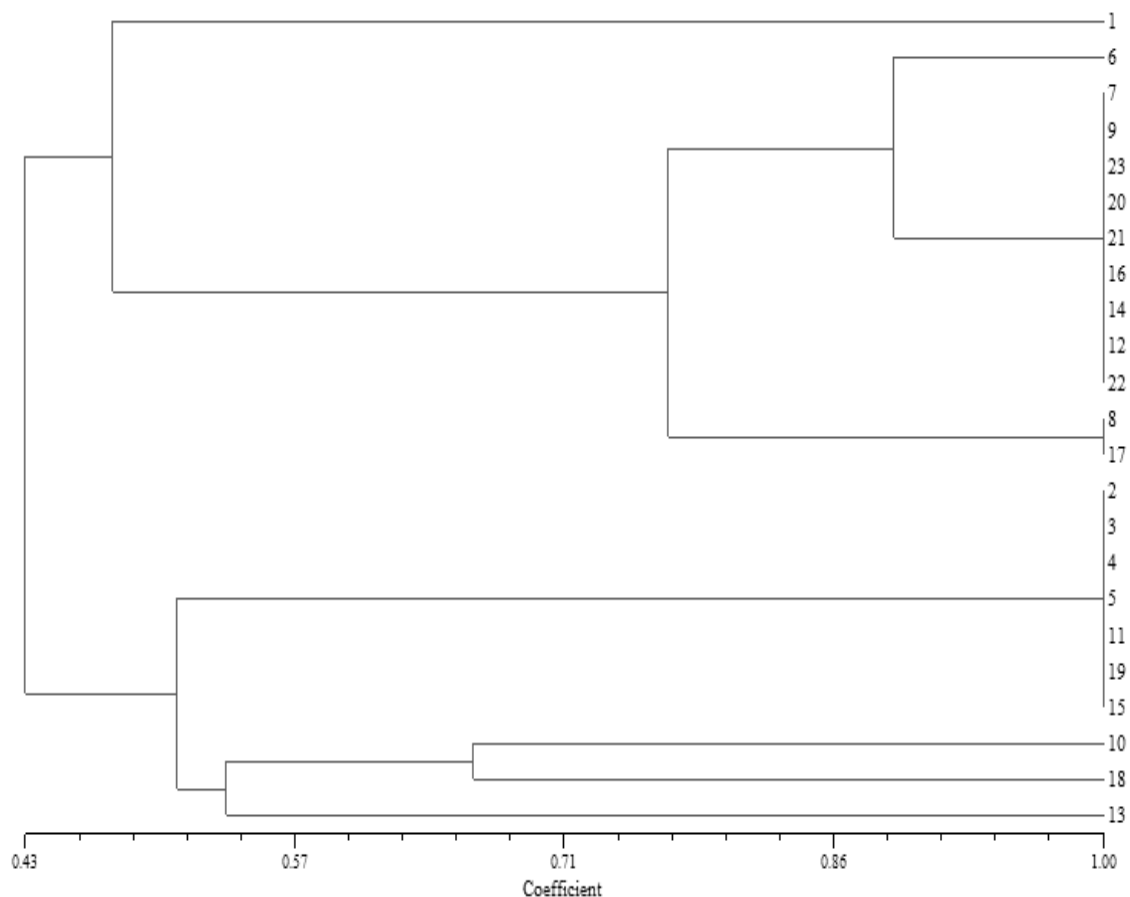


Figura 9. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GTG)₅, obtidos de isolados de *A. fumigatus*. Números 1-10, 21 e 22: isolados ambientais, números 11-20, 23: isolados clínicos.

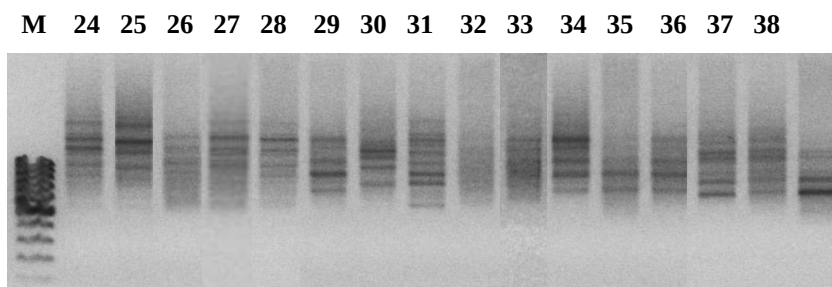


Figura 10. Perfis de amplificação de ISSR obtidos de *A. flavus* com o marcador (GTG)₅. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 24, 29-36: isolados clínicos, pistas 25-28, 37-39: isolados ambientais.

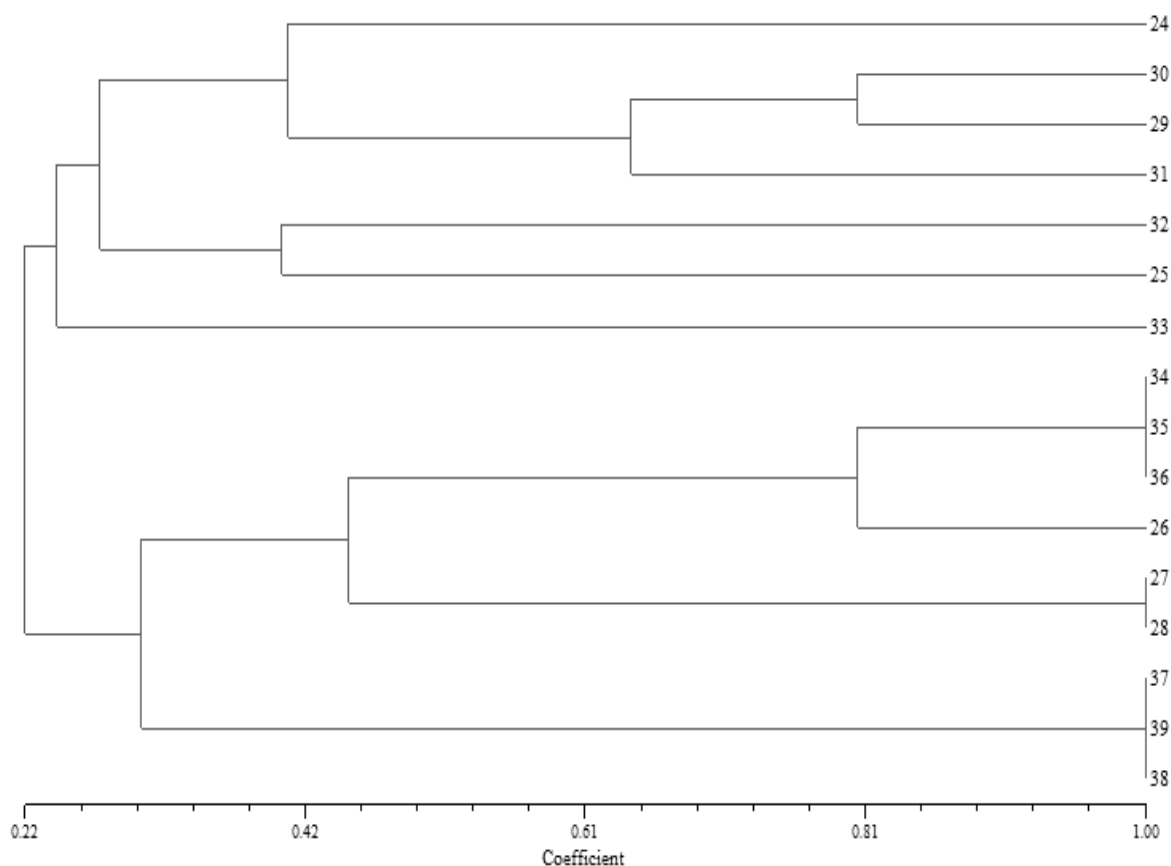


Figura. 11. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GTG)₅, obtidos de isolados de *A. flavus*. Números 24, 29-36: isolados clínicos, números 25-28, 37-39: isolados ambientais.

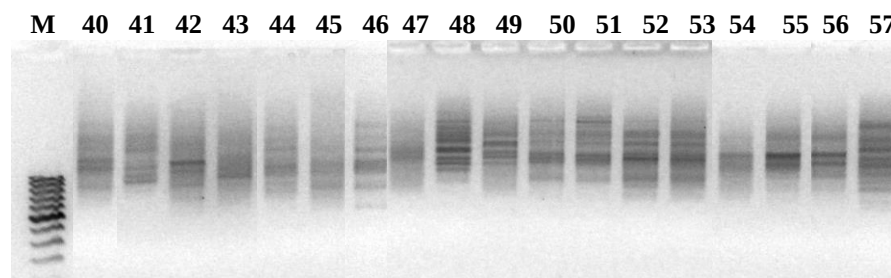


Figura 12. Perfis de amplificação de ISSR obtidos de *A. niger* com o marcador (GTG)₅. Pista M: marcador de peso molecular 1Kb plus; pistas 40, 46-53: isolados clínicos, pistas 41-45, 54-57: isolados ambientais.

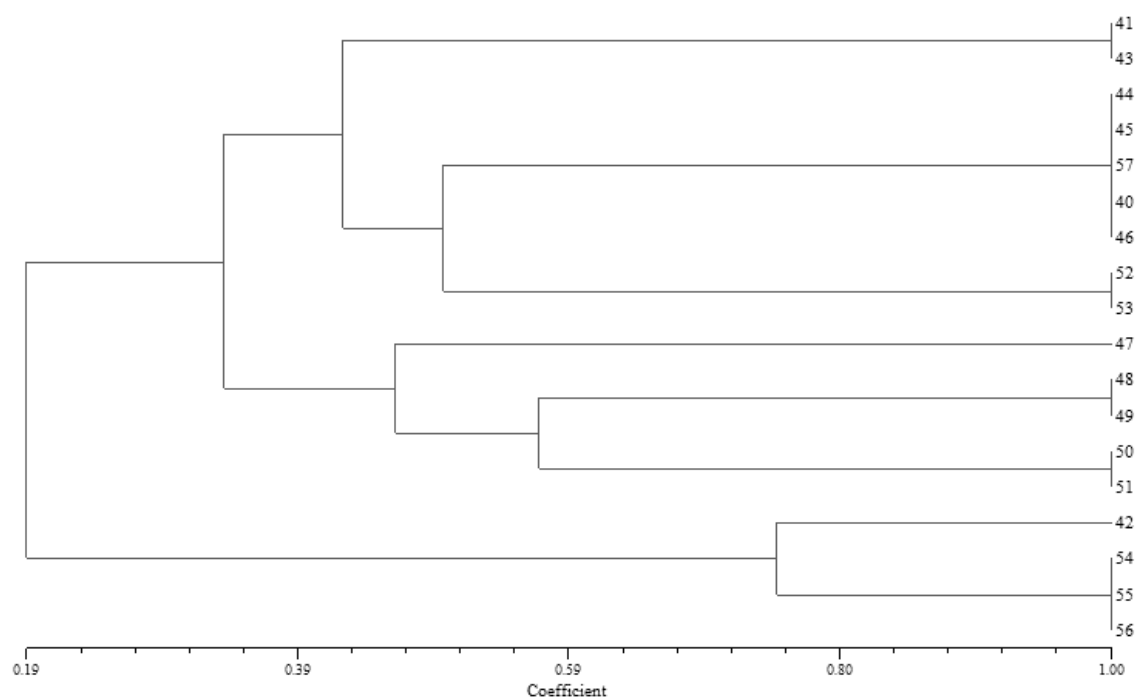


Figura 13. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de amplificação das regiões ISSR com o marcador (GTG)₅, obtidos de isolados de *A. niger*. Números 40, 46-53: isolados clínicos, números 41-45, 54-57: isolados ambientais.

5.3. Produção e quantificação de melanina

Todos os isolados produziram partículas escuras semelhantes em tamanho e forma com os propágulos originais (conídios) das três espécies, que ao serem examinadas ao microscópio óptico revelaram pigmento negro depositado na parede do conídio (Figura 14). Em microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível verificar a integridade da parede celular destes conídios (Figuras 14, 15 e 16).

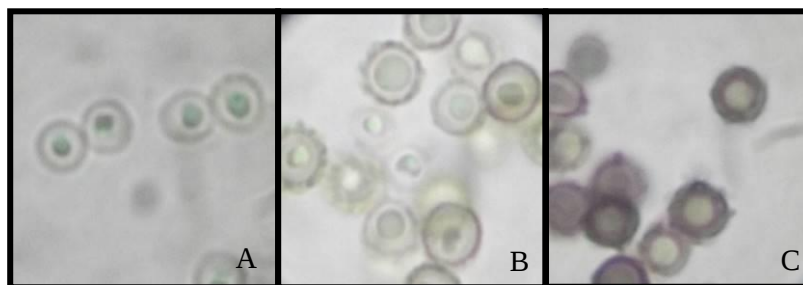


Figura 14. Conídios de *A. fumigatus* URM6560 (A), *A. flavus* URM6315 (B) e *A. niger* URM6794 (C), após tratamentos com enzimas proteolíticas e glicolíticas, agente desnaturante e ácido concentrado em alta temperatura, contendo em sua parede celular partículas escuras de melanina (MO 4700X).

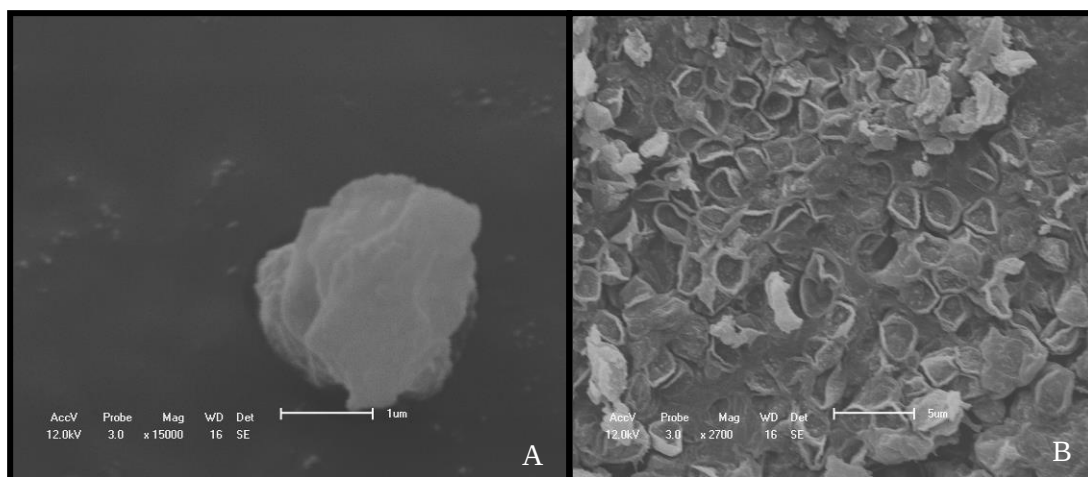


Figura 15. Conídios de *A. fumigatus* URM6560 (A e B), após tratamentos com enzimas proteolíticas e glicolíticas, agente desnaturante e ácido concentrado em alta temperatura (MEV 15000x e 2700x respectivamente).

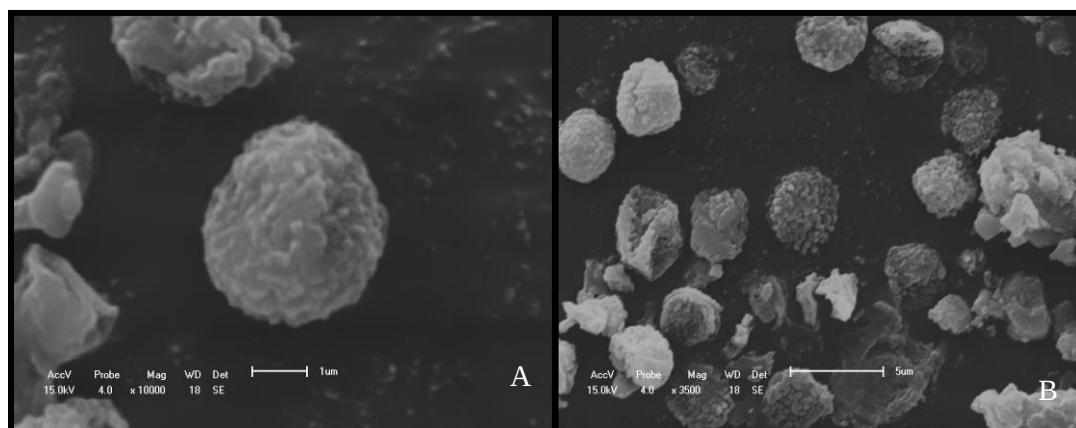


Figura 16. Conídios de *A. flavus* URM6315 (A e B), após tratamentos com enzimas proteolíticas e glicolíticas, agente desnaturante e ácido concentrado em alta temperatura (MEV 10000x e 3500x respectivamente).

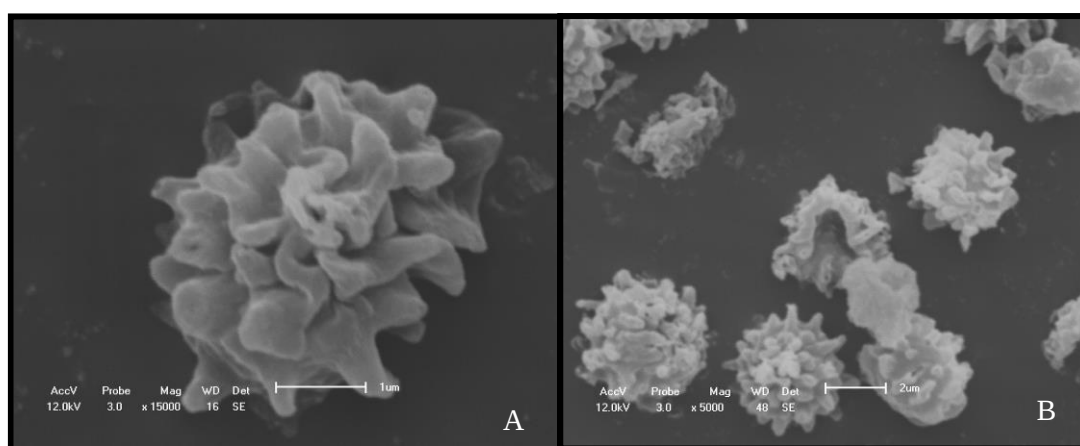


Figura 17. Conídios de *A. niger* URM6794 (A e B), após tratamentos com enzimas proteolíticas e glicolíticas, agente desnaturante e ácido concentrado em alta temperatura (MEV 15000x e 5000x respectivamente).

Os resultados da concentração de melanina das espécies de *Aspergillus* estão descritas nas tabelas 4, 5 e 6. Na tabela 7 estão demonstradas as médias dos pesos secos dos isolados clínicos e ambientais das espécies de *Aspergillus*.

Os valores obtidos por cada grupo foram submetidas à análise estatística, utilizando o teste de normalidade de Shapiro Wilks e ao nível de significância de 0,05% ($p < 0,05$) as amostras seguiram distribuição normal. A seguir foi aplicado um Teste T de Student independente, e ao nível de significância 0,05% ($p < 0,05$) as amostras de cada substrato não apresentaram médias significativamente diferentes. Foi aplicado ainda o teste ANOVA

unifatorial a fim de verificar se os valores médios de melanina de cada espécie e de cada substrato diferiam entre si, porém ao nível de significância de 0,05% ($p < 0,05$), não houve diferença estatística entre os valores das médias de melanina de cada espécie.

Tabela 4. Produção de melanina por isolados de *A. fumigatus*

URM/Número de isolamento	Peso Seco (g)	Substrato/hospedeiro
3372 URM	0,0132	Rizosfera
3550 URM	0,0143	Aveia
3559 URM	0,0128	Aveia
3812 URM	0,0608	Polpa de maracujá
5404 URM	0,0129	Água de viveiro de camarão
5410 URM	0,0123	Água de viveiro de camarão
5492 URM	0,0664	Farinha de amendoim
5698 URM	0,0032	Torta de mamona industrial
5943 URM	0,0168	Solo de mata atlântica
5992 URM	0,0191	Solo de caatinga
6200 URM	0,1486	Fragmento de pulmão
6327 URM	0,0157	Secreção conduto auditivo externo
08-A	0,0149	Escarro
69M	0,1870	LBA
75M	0,0030	Escarro
6559 URM	0,0212	Fragmento de pulmão
120M	0,0403	Escarro
6560 URM	0,0563	Escarro
5049 URM	0,1765	Fragmento de aorta abdominal
6151 URM	0,0235	Solo de mata atlântica
4320 URM	0,0431	Solo de mineradora
6573	0,0305	LBA

Tabela 5. Produção de melanina por isolados de *A. flavus*

URM/ Número de isolamento	Peso seco (g)	Substrato/hospedeiro
08-B	0,0299	Escarro
4541 URM	0,0178	Fubá de Milho
4709 URM	0,0145	Solo
5493 URM	0,0131	Farinha de amendoim
5740 URM	0,0098	Torta de mamona industrial
5987 URM	0,0129	Fragmento de pulmão
6313 URM	0,0536	Escarro
6314 URM	0,1304	Escarro
6325 URM	0,0384	Secreção conduto auditivo externo
6315 URM	0,0496	Escarro
6332 URM	0,0126	Secreção conduto auditivo externo
6333 URM	0,0113	Secreção conduto auditivo externo
HC2A	0,0405	Secreção conduto auditivo externo
68B	0,0296	Solo de caatinga
119D	0,0555	Solo de caatinga
72B	0,004	Solo de caatinga

Tabela 6. Produção de melanina por isolados de *A. niger*

URM/Número de isolamento	Peso seco (g)	Substrato/Hospedeiro
2604 URM	0,0461	Pulmão de Ave
3820 URM	0,0398	Solo de açude
4645 URM	0,0172	Solo
5001 URM	0,0107	Solo
5741 URM	0,0181	Torta de mamona industrial
5838 URM	0,718	Torta de mamona industrial
5924 URM	0,0162	Fragmento de Pulmão
6316 URM	0,0289	Escarro
6317 URM	0,0304	Escarro
6318 URM	0,0694	Escarro
6795 URM	0,0425	Secreção conduto auditivo externo
6794 URM	0,1616	Secreção conduto auditivo externo
6329 URM	0,0113	Secreção conduto auditivo externo
HC2C	0,0095	Secreção conduto auditivo externo
100B	0,0476	Solo de caatinga
26A	0,0631	Solo de caatinga
6C	0,0444	Solo de caatinga
164D	0,0972	Solo de caatinga

Tabela 7. Médias dos pesos secos de partículas de melanina de isolados de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*.

Grupo	Média (g)
Isolados <i>A. fumigatus</i> substrato clínico	0,0450
Isolados <i>A. fumigatus</i> substrato ambiental	0,0587
Isolados <i>A. flavus</i> substrato clínico	0,0334
Isolados <i>A. flavus</i> substrato ambiental	0,0329
Isolados <i>A. niger</i> substrato clínico	0,0838
Isolados <i>A. niger</i> substrato ambiental	0,0871

5.4. Espectroscopia de Infra vermelho (IR)

Os espectros mostrando o perfil de melanina estão ilustrados nas figuras 18 a 20.

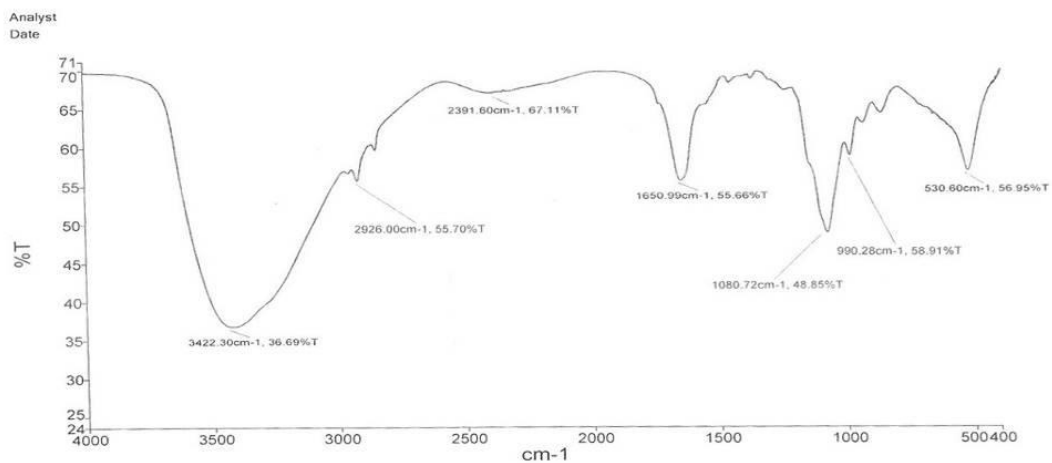


Figura 18. Espectro de infravermelho mostrando o perfil de melanina do isolado de *A. fumigatus* URM 3550.

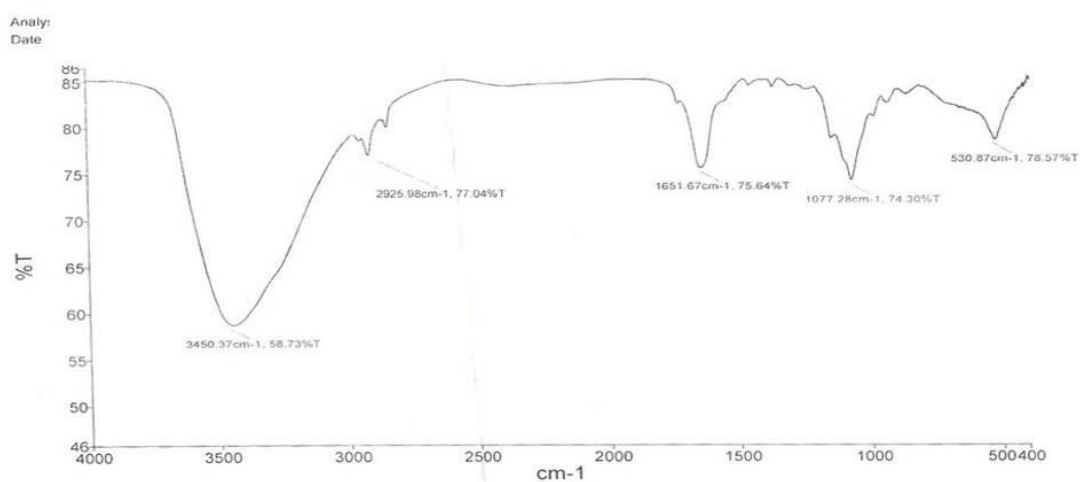


Figura 19. Espectro de infravermelho mostrando o perfil de melanina do isolado de *A. flavus* URM 6333.

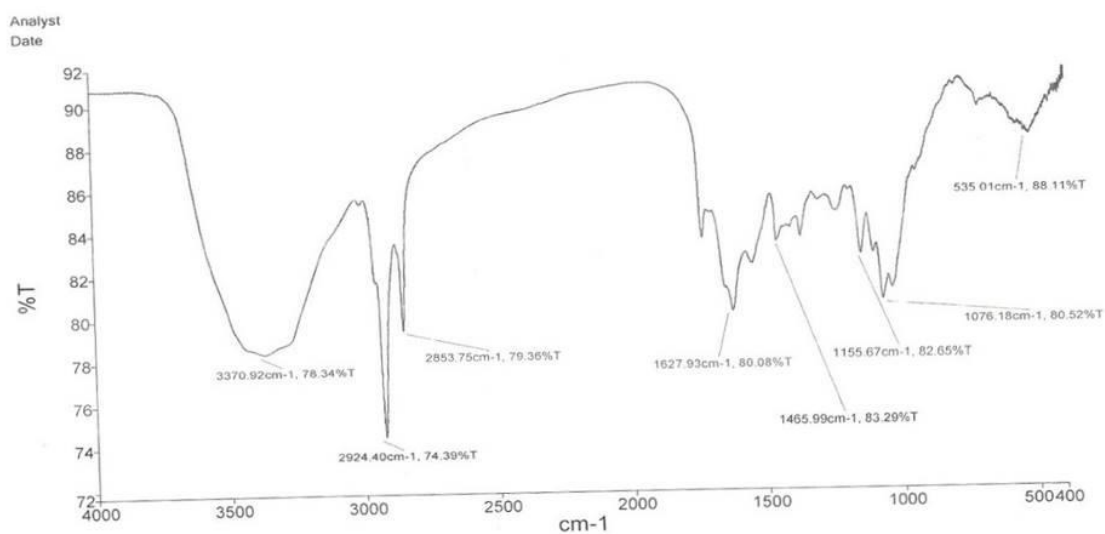


Figura 20. Espectro de infravermelho mostrando o perfil de melanina do isolado de *A. niger* 100B.

Os espectros de infravermelho foram analisados para confirmar o perfil de melanina produzida nos conídios. No espectro, todos os pigmentos revelaram uma larga banda de absorção a $3500\text{-}3000\text{cm}^{-1}$, que pode ser atribuída às vibrações do alongamento

de grupos OH; o pico a $2926-2853\text{cm}^{-1}$, é atribuído ao estiramento NH; um pico de absorção forte a 1633 cm^{-1} corresponde às vibrações dos grupos aromáticos (C=O ou C=C). Esta banda é típica de uma estrutura quinóide conjugada que acredita-se ser importante para a identificação de melanina. O pico de absorção observado em 1100 cm^{-1} corresponde à vibração de um anel aromático CH.

Neste estudo, foi verificada a presença e concentração de melanina produzida por espécies de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, além de seu perfil em espectroscopia de infravermelho, que demonstrou diferenças no tipo de melanina produzida por cada espécie.

5.5. Produção de gliotoxina

Dos 23 isolados de *A. fumigatus*, oito produziram gliotoxina quando comparados ao padrão comercial de gliotoxina pura (Figura 21) nas condições de cultivo e análise estabelecidas, correspondendo a 34,78% do total de isolados testados, sendo detectadas por CLAE (Tabela 8). Dos 11 isolados clínicos, 27% (n=3) produziram gliotoxina (Figura 22), enquanto que dos 12 isolados ambientais, a frequência foi de 42% (n=5) de produtores (Figura 23). A concentração mínima de gliotoxina obtida $0,039\text{mg/ml}$ produzida pelo isolado URM3559 e a máxima $0,150\text{mg/ml}$, produzida pelo isolado URM3812 (Figura 24). Os isolados de *A. flavus* e *A. niger* não produziram gliotoxina nas condições estabelecidas. O tempo de retenção foi entre 11,993 e 12,5 minutos. Outros metabólitos foram produzidos pelas três espécies analisadas durante a obtenção dos extratos brutos, figurando nos cromatogramas, porém não foi possível identificá-los na análise por CLAE (Figura 25).

As repetições da quantificação de gliotoxina foram submetidas a análise estatística pela aplicação do teste de normalidade, e nem todas as amostras seguiram uma distribuição normal. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e ao nível de significância de 0,05% ($p < 0,05$), a produção de gliotoxina entre os isolados foi significativamente diferente. Entre os isolados de origem ambiental, destaca-se o isolado URM3812, com produção média de $0,150\text{mg/ml}$. Entre os isolados clínicos, o melhor produtor foi o 69M, $0,113\text{ mg/ml}$. Para o teste de Kruskal-Wallis não há um *post hoc* para determinar diferenças entre os grupos .

Tabela 8. Concentrações de gliotoxina produzidas por isolados de *A. fumigatus*.

Isolados	Substrato	Concentração de gliotoxina (mg/ml)						Média ± DP
		TR (min)	Rep 1	TR (min)	Rep 2	TR (min)	Rep 3	
6562	Escarro	11,99 3	0,08 0	11,99 3	0,07 8	12,03 3	0,07 9	0,079±0,00 1
69M	LBA	12,16 8	0,11 3	12,14 7	0,11 4	12,15 0	0,11 2	0,113±0,00 1
6560	Escarro	12,26 7	0,10 1	12,17 7	0,09 7	12,20 5	0,09 4	0,097±0,00 4
URM3372	Rizosfera	12,14 8	0,04 4	12,17 8	0,04 4	12,13 7	0,04 5	0,044±0,00 1
URM3559	Aveia	12,40 2	0,03 9	12,41 2	0,04 2	12,40 0	0,03 9	0,039±0,00 1
URM3812	Polpa de maracujá	12,43 8	0,14 8	12,11 7	0,15 0	12,18 3	0,15 1	0,150±0,00 2
URM4320	Solo de mineradora	12,06 0	0,04 4	12,10 3	0,04 4	12,11 2	0,04 4	0,044±0,00 0
URM6151	Solo de mata atlântica	12,25 8	0,07 3	12,27 7	0,08 1	12,30 0	0,08 4	0,081±0,00 6

Legenda: LBA: lavado bronco alveolar, TR: Tempo de retenção, Rep1: Repetição 1, Rep2: Repetição 2, Rep3: Repetição 3, DP: Desvio padrão.

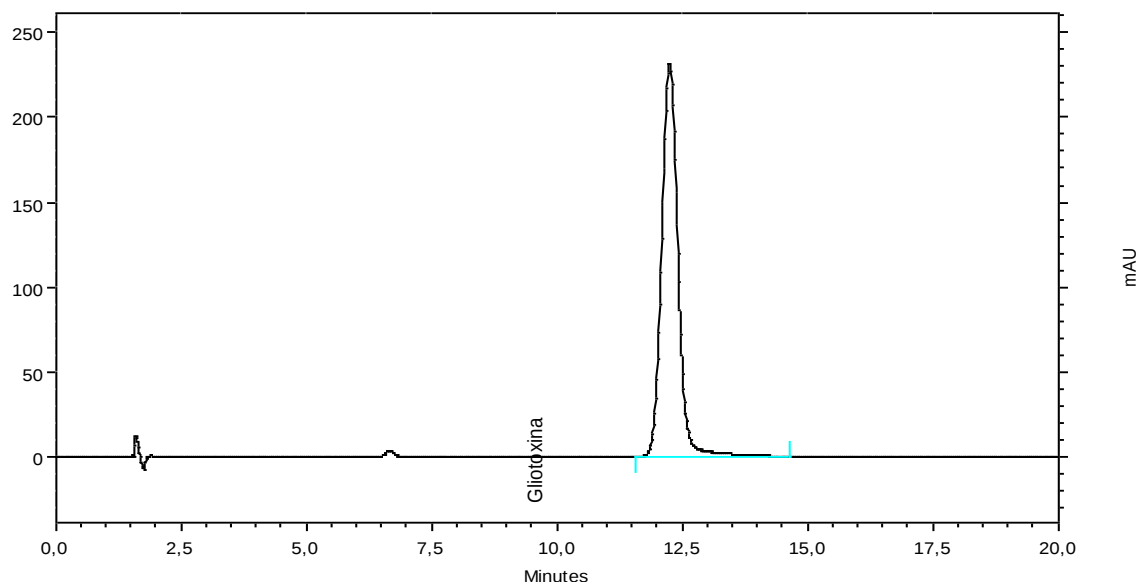


Figura 21. Cromatograma do padrão comercial de gliotoxina pura.

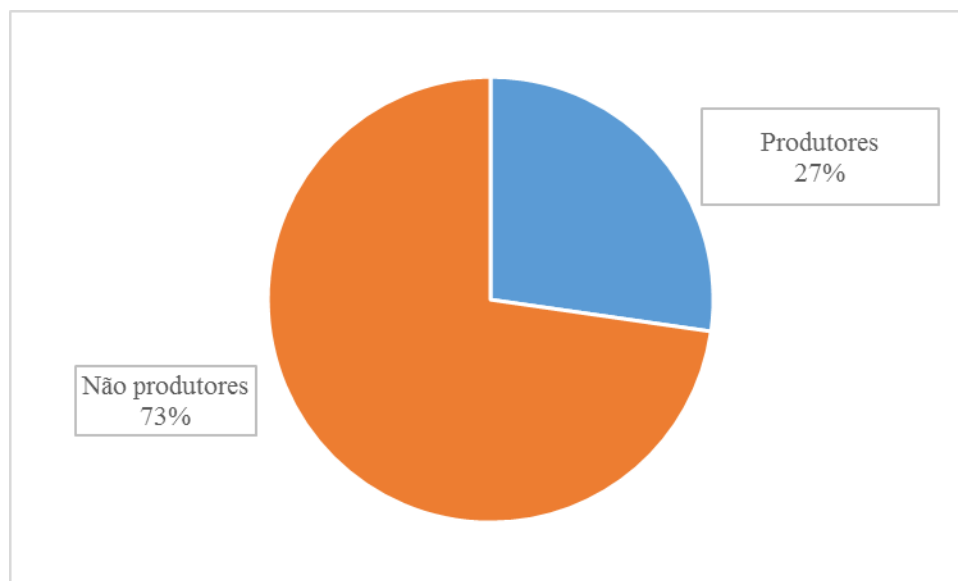


Figura 22. Gráfico mostrando a porcentagem de isolados produtores (27%) e não produtores (73%) de gliotoxina, dentre 11 isolados de *A. fumigatus* de origem clínica.

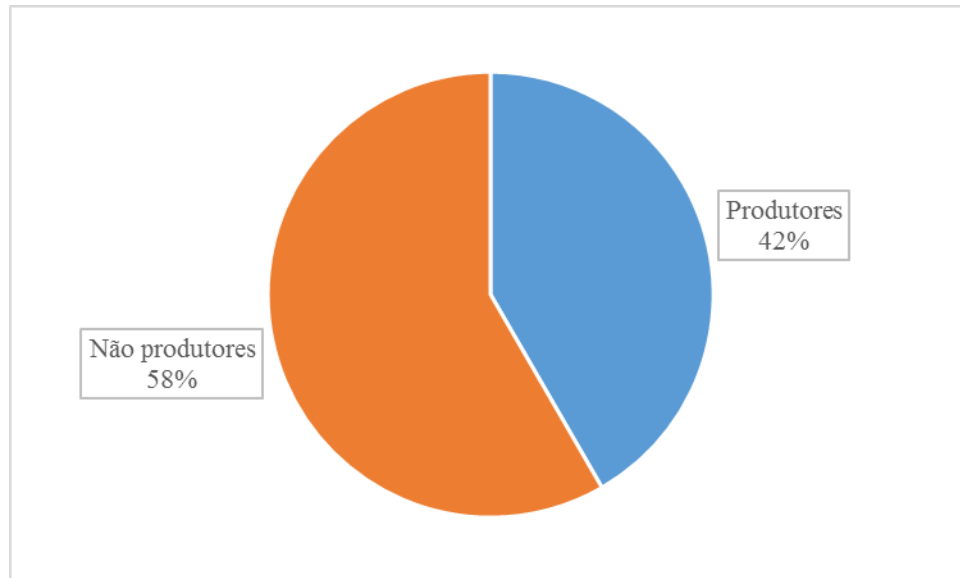


Figura 23. Gráfico mostrando a porcentagem de isolados produtores (42%) e não produtores (58%) de gliotoxina, dentre 12 isolados de *A. fumigatus* de origem ambiental.

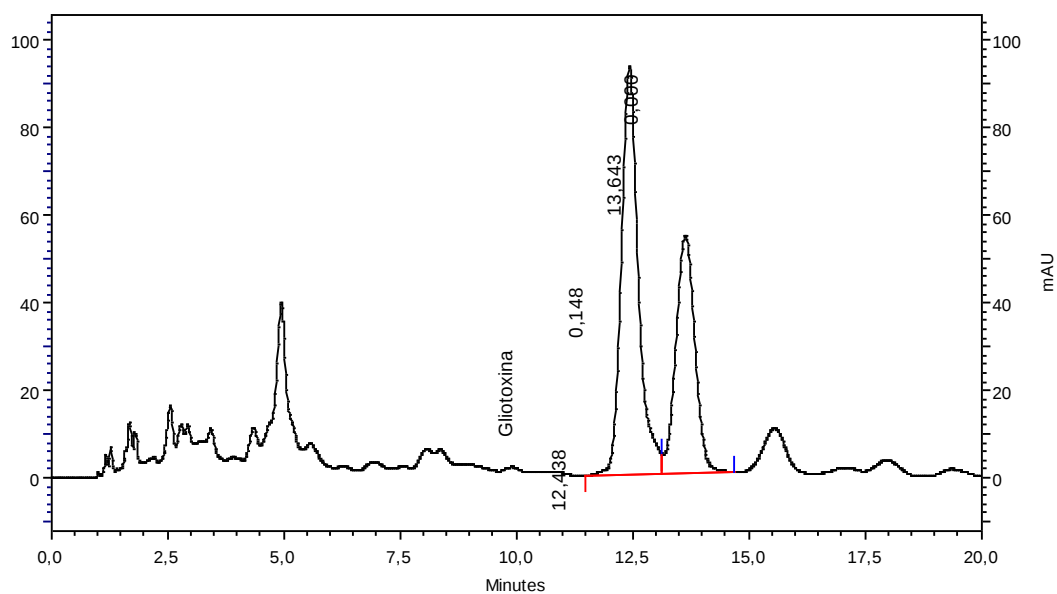


Figura 24. Cromatograma do isolado de *A. fumigatus* URM3812 produtor de gliotoxina.

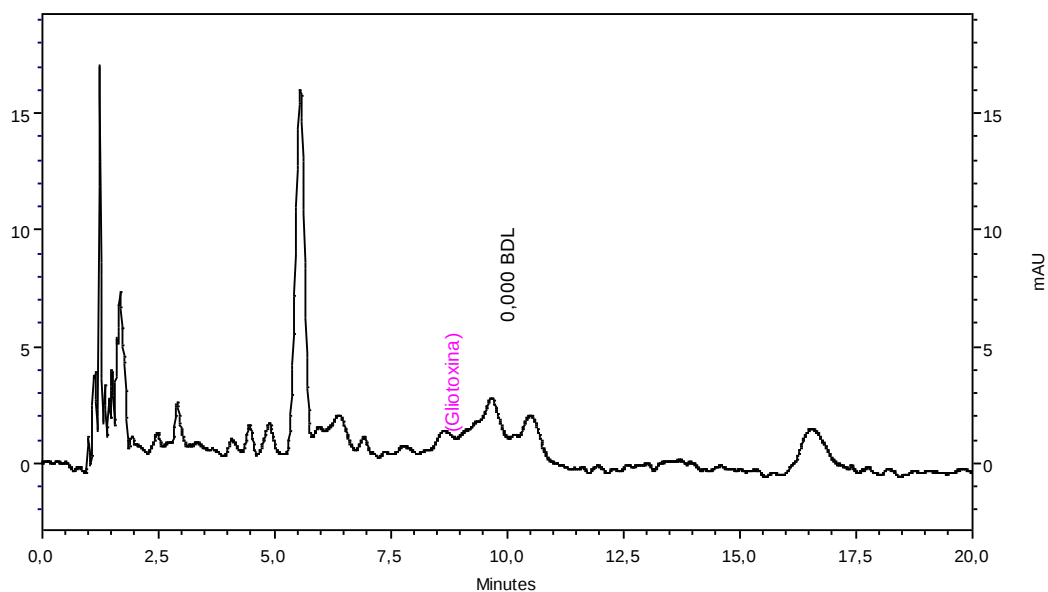


Figura 25. Cromatograma do isolado de *A. fumigatus* URM6573, não produtor de gliotoxina.

5.6. Modelo experimental de aspergilose pulmonar

Foram selecionados os isolados de *A. fumigatus* URM3812, isolado de polpa de maracujá e melhor produtor de gliotoxina, e URM6753, isolado de LBA, e não produtor de gliotoxina para estabelecer o modelo experimental de aspergilose pulmonar.

O modelo de infecção mostrou-se adequado para reproduzir aspergilose pulmonar. Sendo as vias aéreas a principal porta de entrada de propágulos de *Aspergillus* no hospedeiro, representar esta via de infecção demonstrou de forma satisfatória o desenvolvimento da doença e permitiu avaliar e comparar a virulência dos isolados selecionados.

Visto que *A. fumigatus* é um fungo oportunista, a imunossupressão foi necessária para estabelecer aspergilose pulmonar nos camundongos, assim a escolha da droga e o regime de imunossupressão foi primordial para estabelecer com sucesso a doença.

Entre as vias de inoculação, foi escolhida a instilação intranasal, vantajosa por ser menos traumática para o animal e de fácil execução, o que possibilitou um manuseio mais seguro tanto para o camundongo quanto para o manipulador, não causando nenhum trauma físico aos animais.

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 um possível foco de infecção (Figuras 26 e 27). Os fragmentos de tecido coletados foram semeados em meio Ágar Sabouraud acrescido de 50mg/L de cloranfenicol e incubados a temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) e a 37°C .

Paralelamente, foram montadas lâminas destes fragmentos em KOH 40%. Ao exame direto foram observados filamentos micelianos hialinos, septados com e sem dicotomia (Figura 28), e em cultura, foram obtidas colônias cotonosas com pontos granulares, cinza-esverdeada e reverso incolor e microscopicamente cabeças conidiais pequenas e colunares, vesículas, conidióforos de parede lisa e conídios globosos (Figura 29). O exame histopatológico com coloração de hematoxilina-eosina (HE) mostrou intenso infiltrado inflamatório com presença de numerosos neutrófilos, armadilhas extracelulares de neutrófilos, múltiplos granulomas e presença de filamentos micelianos hialinos com e sem dicotomia (Figura 30).

O modelo proposto reproduziu satisfatoriamente a aspergilose pulmonar para ambos os isolados, o que foi confirmado pelos achados no exame direto, histopatológico e recuperação dos agentes em cultura; o que está em consonância com os postulados de Henle-Koch.

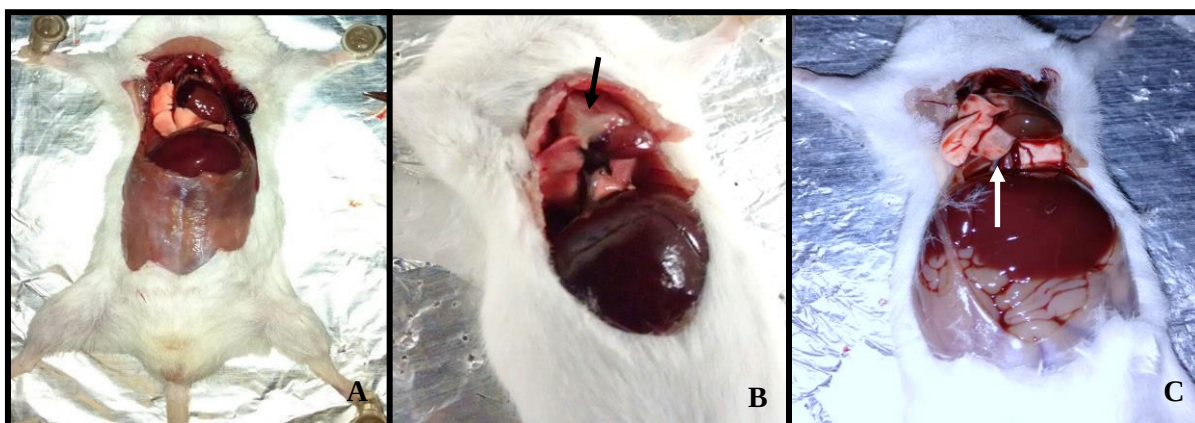


Figura 26. Eutanásia com 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C) dos camundongos infectados com o isolado URM6753. A seta indica uma zona de aspecto diferenciado nos pulmões, pálida, indicando um possível foco de infecção.



Figura 27. Lobos pulmonares direitos, com zona de aspecto diferenciado, pálido, indicando um possível foco de infecção.

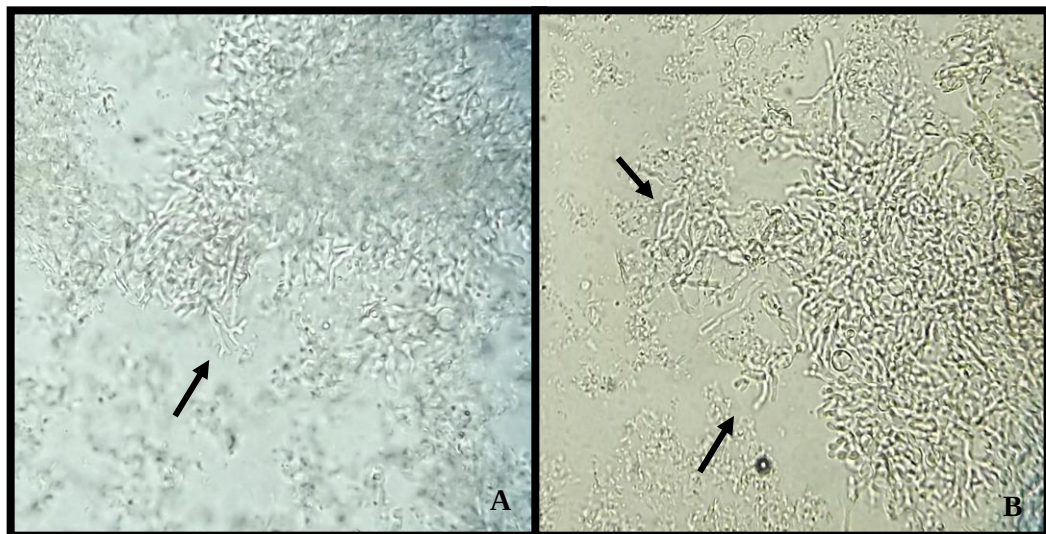


Figura 28. Exame direto de fragmentos de pulmão clarificado com KOH a 40%, evidenciando filamentos micelianos hialinos, septados com e sem dicotomia (A e B) após 48 horas de infecção.

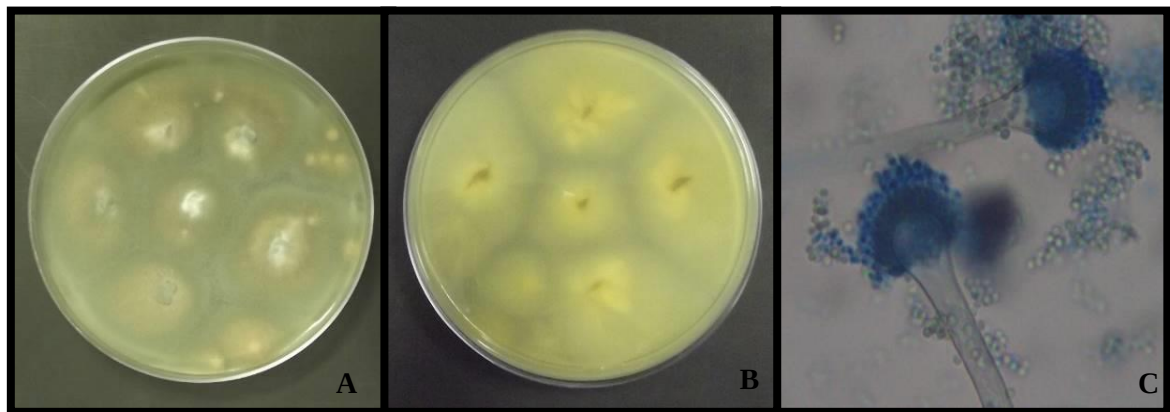


Figura 29. Verso (A) e reverso (B) do semeio de fragmentos de pulmão em meio Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (50mg/l), após 3 dias, mostrando o crescimento de colônias cotonosas com pontos granulares, cinza-esverdeada e reverso incolor. Microscopicamente (C) cabeças conidiais pequenas e colunares, vesículas, conidióforos de parede lisa e conídios globosos.

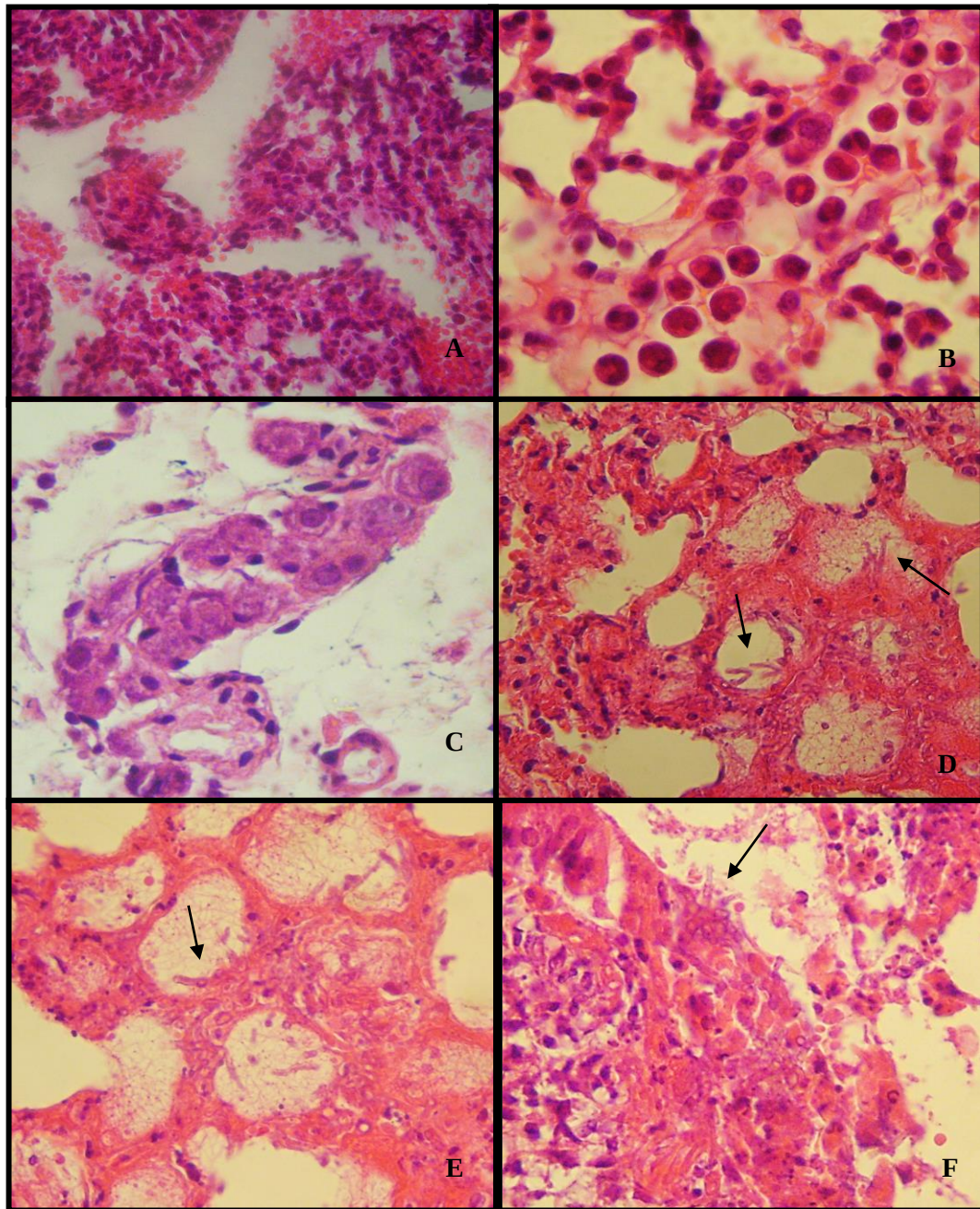


Figura 30. Tecido pulmonar dos camundongos infectados, mostrando intenso infiltrado inflamatório com numerosos neutrófilos (A), neutrófilos (B), múltiplos granulomas (C), armadilhas extracelulares de neutrófilos (D e E) e presença de filamentos micelianos hialinos com e sem dicotomia (D, E, F). (HE 720x). As figuras A, C e E são provenientes de tecido infectado com o isolado URM6753, e as figuras B, D e F, são provenientes de tecido infectado com o isolado URM3812.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise da variabilidade genética

A análise dos géis de agarose revelou certa heterogeneidade genética entre os isolados, destacando-se os isolados de *A. flavus* e *A. niger* com o uso dos marcadores (GACA)₄ e (GTG)₅, havendo agrupamentos em função da origem. O marcador (GTG)₅ foi o que melhor agrupou os isolados em função da origem clínica ou ambiental. O marcador (GACA)₄ mostrou certa variabilidade genética entre os isolados da mesma espécie.

Para *A. fumigatus*, o marcador (GACA)₄, evidenciou o agrupamento de alguns isolados em função da origem, sendo formados três grupos com 100% de similaridade, nos quais o segundo grupo foi composto apenas por isolados ambientais, e o terceiro grupo composto em sua maioria por isolados clínicos. O marcador (GTG)₅ evidenciou similaridade genética entre isolados de *A. fumigatus* de diferentes origens. Ambos marcadores agruparam os mesmos isolados de substrato ambiental (22, 24, 52, 53) em um grupo com 100% de similaridade, indicando que estes isolados são geneticamente relacionados.

Araújo *et al.* (2009) utilizaram um conjunto de oito marcadores MC1, MC2, MC5, MC3, MC6a, MC6b, MC7 e MC8, desenhados a partir de regiões microssatélite de sequências conhecidas de *A. fumigatus*, para a determinação do genótipo de 116 isolados clínicos de *A. fumigatus* obtidos a partir de três unidades de saúde. A comparação dos grupos de cepas de diferentes centros de saúde (dois hospitais universitários e um hospital oncológico), utilizando o teste de ANOVA, mostrou que não houve diferenças significativas entre os grupos e que 99,6% da variação genotípica foi intrapopulacional.

Balajee *et al.* (2008) aplicou um método que emprega um conjunto de 9 *loci* microssatélites em PCRs multiplex, chamado de ensaio STRAf (Short tandem repeat of *Aspergillus fumigatus*) descrito para *fingerprinting* de isolados de *A. fumigatus*, para avaliar a diversidade genética entre 55 isolados de *A. fumigatus* obtidos de seis investigações diferentes de surtos, identificados como OB1 a OB6. O estudo demonstrou que os resultados do ensaio STRAf foram similares a resultados anteriores obtidos outros métodos de genotipagem, identificando que os surtos OB2 e OB6 poderiam ser atribuídos a uma fonte comum de exposição, enquanto os outros surtos foram provenientes de várias fontes, com vários genótipos independentes identificados.

Foi verificada alta variabilidade genética entre os isolados de *A. flavus*, com ambos marcadores, corroborando a literatura. O marcador (GACA)₄ mostrou a formação de quatro grupos com 100% de similaridade e o marcador (GTG)₅, a formação de três grupos com 100% de similaridade, havendo agrupamentos em função da origem.

Batista *et al.* (2008), avaliando 25 isolados clínicos e ambientais de *A. flavus* e espécies relacionadas relatou alta diversidade genética utilizando marcadores moleculares ISSR (GACA)₄ e (GTG)₅ e que a utilização do marcador (GACA)₄ evidenciou maior diversidade em relação ao (GTG)₅, embora o último tenha mostrado um perfil de bandas característico para a espécie.

Avaliando a diversidade genética através de marcadores moleculares específicos entre 63 cepas de *A. flavus* isoladas de pacientes e do ambiente hospitalar, em unidade hematológica, Hadrich *et al.* (2010) relatam heterogeneidade genética, em que cada um dos isolados de um paciente e do ambiente hospitalar tinha genótipos diferentes, destacando ainda que em dois pacientes com aspergilose invasiva, o mesmo genótipo foi encontrado em amostras clínicas e ambientais, indicando colonização e infecção adquirida no hospital.

Rudramurthy *et al.* (2011) utilizaram nove marcadores microssatélites selecionados a partir do genoma de *A. flavus* foram utilizados para tipagem de 162 isolados clínicos de *A. flavus*. Destes, treze amostras eram uma mistura de diferentes genótipos, e dos 149 isolados puros, 124 genótipos diferentes puderam ser reconhecidos, demonstrando grande diversidade genotípica em isolados clínicos de *A. flavus*, ressaltando que microssatélites são excelentes alvos para tipagem para discriminar entre isolados de *A. flavus* provenientes de diferentes substratos.

Wang *et al.* (2012) realizaram um estudo de variabilidade genética utilizando 98 isolados de *A. flavus* de diferentes regiões dos Estados Unidos, constatando mais de 75% de variabilidade entre os isolados testados e a formação de seis grupos sem associações diretas entre espécies hospedeiras, região geográfica ou produção de aflatoxina.

Zhang *et al.* (2013) examinaram a diversidade genética entre 24 cepas de *A. flavus* isoladas de solo de plantações de amendoins utilizando os marcadores UBC 809, UBC 817, UBC 834, UBC 895, UBC e 899, os quais agruparam os isolados em cinco grupos, demonstrando a viabilidade do uso de marcadores ISSR para separar todas as estirpes.

O marcador (GACA)₄ mostrou variabilidade genética entre os isolados de *A. niger*, formando três grupos com 100% de similaridade, sendo o primeiro e o segundo grupo compostos por isolados de origens diferentes, demonstrando similaridade genética entre

estes isolados. O marcador (GTG)₅ mostrou maior homogeneidade genética, formando quatro grupos com 100% de similaridade, agrupando os isolados em função da origem.

Não foram encontrados trabalhos sobre variabilidade genética em isolados clínicos e ambientais de *A. niger*, uma espécie importante devido a seu potencial biotecnológico, mas que também é agente de otomicoses, micoses cutâneas e menos frequentemente, sistêmicas. Esteban *et al.* (2008) analisou a variabilidade genética utilizando marcadores moleculares entre 68 espécies de *A. niger* de diferentes regiões geográficas e potencialmente produtoras de ochratoxina, encontrando altos níveis de polimorfismo, e destacando que a análise pelos marcadores microssatélites foi mais rápida e mais simples, em comparação a outras técnicas, além de mais reproduzível, indicando que esta é uma técnica adequada para utilização em estudos de grande escala das populações de *A. niger*.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram, dependendo do marcador utilizado, variabilidade genética entre os isolados provenientes de amostras clínicas e ambientais, agrupamentos em função da origem do substrato.

Poucos trabalhos relatam a avaliação da similaridade genética entre isolados de *Aspergillus* de origem clínica e ambiental utilizando os marcadores moleculares ISSR (GACA)₄ e (GTG)₅. Neste trabalho foi verificada a eficiência da utilização destes marcadores para avaliação da variabilidade intra-específica entre isolados de *Aspergillus*.

Devido à crescente incidência de infecções fúngicas, métodos de análise da diversidade molecular têm sido utilizados para identificar isolados epidemiologicamente relacionados, distinguir entre isolados não relacionados de uma determinada espécie, monitorar a disseminação de isolados microbianos específicos e estudar os aspectos genéticos da população de um organismo. Uma das técnicas moleculares empregada para este fim é a utilização de marcadores moleculares ISSR, que têm se mostrado eficazes para evidenciar diferenças e semelhanças genotípicas entre isolados de *Aspergillus*.

6.2. Produção e quantificação de melanina em espécies de *Aspergillus*

Muitas espécies de fungos produzem melanina, um pigmento biologicamente importante, e encontrada em toda a natureza, muitas vezes fornecendo um papel de proteção, tal como a radiação ultravioleta. Apesar de sua importância e onipresença, há muitas questões fundamentais não respondidas em relação ao pigmento, tal como os pormenores da sua estrutura química. Isto é devido ao fato de que a melanina é insolúvel e,

por conseguinte, não pode ser estudada pelas técnicas bioquímicas convencionais (Nosanchuk; Casadevall, 2003; Eisenman; Casadevall, 2012).

A produção de melanina está ligada a virulência através da promoção da sobrevivência do propágulo fúngico no interior do hospedeiro, permitindo assim que o microrganismo cause doença e também produzindo uma resposta inflamatória intensa que resulta em danos ao hospedeiro. A melanina é necessária para a montagem correta das diferentes camadas da parede dos conídios em *A. fumigatus*, facilitando, assim, a aderência e outros fatores de virulência na superfície de conídios, enquanto que na natureza a melanina protege contra agentes oxidantes, variações de temperatura e radiação ultra violeta (UV) (Heinekamp *et al.*, 2012; Upadhyay *et al.*, 2013; Amin *et al.*, 2014; Sundaram *et al.*, 2014).

Neste estudo, foi verificado que os isolados de *A. niger* produziram numericamente maior quantidade de melanina, seguido dos isolados de *A. fumigatus* e *A. flavus*. Contudo não houve diferença estatística entre a produção de melanina entre isolados clínicos e ambientais.

A produção de melanina por isolados de *A. fumigatus* verificada neste estudo corrobora o trabalho de Youngchim *et al.*, (2004), que obteve melanina a partir de conídios de *A. fumigatus* e descrevem a produção de anticorpos monoclonais reativos a partir de melanina para o estudo da melanização *in vitro* e durante a infecção. Neste trabalho foi possível estimar a quantidade de partículas de melanina produzida por cada isolado através do peso seco, o que está diretamente ligado à capacidade de esporulação de cada isolado.

Os resultados obtidos neste estudo quanto à produção e quantificação de melanina com quantidade média de 17mg/ml de melanina para isolados de *A. niger*, e 6,5mg/ml para *A. flavus*, são superiores aos obtidos por Pal *et al.* (2014), no qual *A. flavus* produziu 1,43mg e *A. niger* 2,24mg de melanina por ml, a partir da biomassa fúngica. Apesar do emprego de método analítico quantitativo diferente do utilizado no referido trabalho, é importante salientar que os isolados utilizados e a metodologia utilizada foram capazes de obter uma quantidade superior de melanina a partir de conídios de *Aspergillus*.

Foram observadas ainda diferenças nos perfis de melanina obtidos por espectroscopia de infravermelho, que podem ser atribuídas à via de biossíntese. Para uma melhor compreensão da estrutura química do pigmento produzido por diferentes espécies,

faz-se necessário o emprego de técnicas analíticas mais acuradas. Estes picos de absorção característicos para cada um dos pigmentos extraídos são semelhantes aos observados a espectros de melanina fúngica obtidos por Pal *et al.* (2014).

Localizada na superfície exterior de conídios, a melanina fúngica pode influenciar a resposta imunológica do hospedeiro. Em *A. fumigatus*, a melanina inibe a apoptose em macrófagos que fagocitam conídios melanizados (Volling *et al.* 2011), assim como a produção de citocinas, possivelmente através do bloqueio do reconhecimento pelo sistema imunológico de padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) como β -glucana e manana, localizados na superfície dos conídios (Chai *et al.*, 2010).

A parede celular fúngica é uma estrutura de múltiplas camadas que proporciona forma à célula e proteção contra o estresse osmótico, além de seu papel evasor do sistema imunológico. Bayry *et al.* (2014) destacam a importância da melanina na organização da parede celular de conídios de *A. fumigatus* demonstrando o efeito da deleção dos genes $\Delta pksP$, $\Delta ayg1$, e $\Delta arp2$, ligados à biossíntese de intermediários de melanina na ativação de células imunitárias do hospedeiro; a supressão individual dos genes envolvidos nos três primeiros passos da biossíntese de melanina resultou na alteração da superfície dos conídios, com camadas em bastão e parede celular permeável permitindo a deposição de proteínas na superfície celular e a exposição dos polissacarídeos da célula na superfície da parede. A melanina, como tal, foi imunologicamente inerte; no entanto, os conídios mutantes com deleção dos genes $\Delta pksP$, $\Delta ayg1$, e $\Delta arp2$ com superfícies modificadas foram capazes de ativar as células dendríticas humanas e a subsequente produção de citocinas, em contraste com conídios do tipo selvagem.

Sendo a evasão da apoptose celular do hospedeiro uma estratégia importante de muitos agentes patogênicos para estabelecer uma infecção, constatou-se que *A. fumigatus* inibe a apoptose em diferentes tipos de células epiteliais alveolares. A melanina também é essencial para prevenir acidificação do fagolisossomo nas células epiteliais alveolares para sobreviver no meio intracelular. Uma hipótese corrente é que, uma vez que a atividade fagocítica de células epiteliais alveolares é bastante baixa, alguns conídios podem persistir dentro dessas células e, assim, representar um reservatório infeccioso após a diminuição da resposta do sistema imunológico do hospedeiro (Upadhyay *et al.*, 2013; Amin *et al.*, 2014; Heinekamp *et al.*, 2015).

Apesar das dificuldades inerentes ao estudo da melanina, um progresso considerável tem sido feito nos últimos anos em compreender o conjunto de síntese, parede celular, função e degradação de melaninas fúngicas, assim como estudos sobre a caracterização de genes que codificam enzimas de ambas as vias de biossíntese, a utilização de inibidores e detecção de produtos intermédios das vias biossintéticas. Considerando as funções protéicas associadas a melanina, é provável que este pigmento deve possuir uma alta complexidade estrutural (Nosanchuk; Casadevall, 2003; Eisenman; Casadevall, 2012; Pal *et al.*, 2014).

6.3. Produção e quantificação de gliotoxina em espécies de *Aspergillus*

Vários estudos sugerem que a supressão da função imunológica do hospedeiro por metabólitos secundários liberados por fungos é um dos possíveis mecanismos de evasão do patógeno do sistema imunológico. A gliotoxina, uma epipolítiodioxopiperazina (ETP), é um dos metabólitos mais tóxicos produzidos durante o crescimento de várias espécies de fungos, incluindo espécies de *Aspergillus*, constituindo o alvo de muitas investigações sobre a sua estrutura e atividade (Gardiner *et al.*, 2005; Kupfahl *et al.*, 2008; Cerqueira *et al.*, 2014).

Devido às suas potentes propriedades imunomoduladoras negativas, além de ser facilmente detectada durante a infecção experimental, com apenas 24 horas de cultivo e em soros de pacientes com aspergilose, a gliotoxina tem sido o foco de intenso interesse científico. Contudo, apesar de várias espécies de *Aspergillus* serem capazes de produzir gliotoxina, nem toda cepa é produtora de gliotoxina (Kwon-Chung; Sugui, 2009; Speth *et al.*, 2011; Scharf *et al.*, 2012; Kwon-Chung; Sugui, 2013; Cerqueira *et al.*, 2014).

Neste trabalho, foi possível detectar e quantificar a produção de gliotoxina em oito de um total de 23 isolados de *A. fumigatus*, o que representa uma frequência de 34,78%. O teste de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 0,05% ($p < 0,05$) mostrou que a produção de gliotoxina entre os isolados foi significativamente diferente.

De 11 isolados clínicos testados, três 27% foram produtores de gliotoxina, com concentração mínima de 0,079mg/ml e máxima de 0,113mg/ml. Estes resultados divergem dos obtidos por Lewis *et al.* (2005a), que relataram uma frequência de 93% de produtores de gliotoxina entre 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). Kupfahl *et al.* (2008) também referem uma produção de gliotoxina que varia de 93% a 98% entre cepas de *A. fumigatus*, isoladas do trato respiratório de pacientes.

A detecção de gliotoxina em cinco dos 12 isolados ambientais (42%) de *A. fumigatus* está de acordo com os resultados obtidos por El-Shanawany *et al.* (2005) que verificou a produção de gliotoxina em 33% de isolados de *A. fumigatus* provenientes de silagem, e como também por Santos *et al.* (2003) que relatam que apenas 11% das cepas de *A. fumigatus* isoladas de silos foram produtores de gliotoxina. Contudo os resultados obtidos neste trabalho discordam dos obtidos por Kupfahl *et al.* (2008), que relatam que a frequência da produção de gliotoxina em cepas ambientais de *A. fumigatus* chega a 96%.

A não detecção de gliotoxina em culturas de *A. flavus* e *A. niger* contrapõe os resultados obtidos por Kupfahl *et al.* (2008), que verificaram uma frequência de 13% (n=15) de produtores de gliotoxina para *A. flavus* e 44% (n=16) para *A. niger*, assim como o estudo de Lewis *et al.* (2005a) em estudo conduzido com isolados de *Aspergillus* a partir de amostras respiratórias e tecidos de pacientes com câncer no Anderson Cancer Center, em Houston, Texas (EUA) relatam uma frequência de produtores de gliotoxina de 4% dos isolados de *A. flavus* (n=18) e 75% de cepas de *A. niger* (n=9).

Não foi possível a detecção de gliotoxina nos filtrados das culturas de *A. flavus* e *A. niger*, dentro das condições de cultivo e análise estabelecidas. Uma provável explicação deste achado é que a produção de gliotoxina atua como um fator de virulência *in vivo* e, assim, é necessária para estabelecer a infecção por *Aspergillus*. Esta hipótese é apoiada pela observação de que a gliotoxina com frequência retarda significativamente o movimento ciliar e também causa dano ao epitélio ciliado respiratório humano (Hohl; Feldmesser, 2007; Kupfahl *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que micotoxinas em geral, são mecanismos de defesa dos fungos, a ausência de outros microorganismos que eventualmente atuariam como competidores pode ter reduzido a capacidade de produzir gliotoxina, além do tempo e condição anterior de preservação em coleção de culturas de quase todos os isolados (Guimarães, 2011).

Svahn *et al.* (2014) analisaram níveis de gliotoxina por CLAE e espectrometria de massa. A presença de lipopolissacarídeos derivados de bactérias, peptidoglicano, ou ácido lipoteicóico no meio de crescimento a uma concentração de 5 µg/ml aumentou a

concentração de gliotoxina nos meios de cultura em 37%, 65%, e 35%, respectivamente. Estes achados sugerem uma correlação entre as concentrações de padrões moleculares associados a patógenos e a secreção de gliotoxina, demonstrando que existe nos fungos um sistema de detecção destes compostos ainda desconhecido. É possível que o aumento na produção de gliotoxina resulte em aumento da virulência de *A. fumigatus* durante a co-infecção bacteriana, que é importante para a transição da colonização para a invasividade nesta doença pulmonar.

6.4. Estabelecimento do modelo animal

Os modelos animais têm sido utilizados para avaliar novas ferramentas diagnósticas e estudos de novas drogas para tratamento da aspergilose invasiva, e também para avaliar a patogenicidade e virulência características destes fungos (Patterson, 2005; Gravelat *et al.*, 2008; Sugui *et al.*, 2008; Schumann *et al.*, 2010).

Os modelos animais são importantes para o estudo da patogênese, virulência, imunologia, diagnóstico e tratamento de infecções fúngicas. Várias espécies de animais têm sido utilizadas em pesquisas, sendo o camundongo a espécie de escolha. A indução imunossupressora é geralmente necessária para as infecções experimentais com fungos oportunistas serem bem sucedidas, assim como foi demonstrado neste estudo (Souza *et al.*, 2011; Xiao-Hui *et al.*, 2011).

A ciclofosfamida é um dos mais comuns agentes antineoplásicos e imunossupressores utilizado para a prevenção da rejeição do transplante de órgãos, doença do enxerto contra hospedeiro e tratamento de algumas doenças autoimunes crônicas. É um agente citotóxico não específico que pode inibir tanto a imunidade humoral como celular, desempenhando os papéis antineoplásico e imunomodulador, dependendo da dose e frequência do tratamento (Souza *et al.*, 2011; Xiao-Hui *et al.*, 2011).

Neste trabalho foi observado que todos os animais mostraram letargia, pelagem sem brilho, relutância em atividade ambiental, piloereção e redução da ingestão de alimentos e água no dia 1 após a primeira injeção de ciclofosfamida, sendo lentamente restaurados, assim como observado por Xiao-Hui *et al.* (2011).

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

Neste trabalho, não foi infligido dano por trauma de inoculação à nenhum dos animais em experimento. Miller *et al.* (2012) destacaram a instilação intranasal como 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 este tipo de via de inoculação não invasiva preveniu a morte por inoculação traumática.

As estruturas fúngicas observadas em parasitismo, filamentos micelianos hialinos, separados com e sem dicotomia, visualizadas em exame direto de fragmentos de pulmão e no histopatológico são compatíveis às descritas para o diagnóstico de aspergilose (Shepard *et al.*, 2004; Balloy *et al.*, 2005).

As alterações teciduais observadas no exame histopatológico com coloração de HE, mostraram intenso infiltrado inflamatório com presença de numerosos neutrófilos, armadilhas extracelulares de neutrófilos, múltiplos granulomas e presença de filamentos micelianos hialinos com e sem dicotomia. Estes achados são comuns na aspergilose pulmonar (Shepard *et al.*, 2004).

Os neutrófilos são reconhecidos como uma defesa celular inata essencial contra a AI, assim como a duração e extensão da neutropenia, bem como defeitos qualitativos da função dos neutrófilos estão entre os fatores de risco mais prevalentes para o desenvolvimento da AI. Ao contrário de macrófagos, neutrófilos são raramente encontrados nos pulmões de camundongos normais. No entanto, esta situação muda drasticamente em poucas horas após a infecção por *A. fumigatus*, quando os neutrófilos são rapidamente recrutados para o foco infeccioso, como observado neste estudo e confirmado por Cunha *et al.* (2014).

Armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) são definidos pela liberação extracelular de proteínas granulares nucleares, citosólicas e cromatina que se misturam em estruturas filamentosas em forma de rede e possuem atividade antimicrobiana. Após a

ruptura da membrana, as redes são formadas pela mistura intracelular de DNA nuclear com conteúdo granular e, em seguida, liberadas de forma explosiva em questão de segundos, em um processo que está associado com a morte celular. Enquanto a apoptose de neutrófilos representa a morte celular fisiológica não inflamatória, a formação e liberação de NETs resulta na liberação de produtos antimicrobianos que provavelmente ampliam a defesa extracelular, mas podem também serem prejudiciais para o tecido do hospedeiro (Bruns *et al.*(2010) e Röhm *et al.* (2014).

A identificação de NETs, que são uma estratégia de defesa produzida pela morte de neutrófilos é um achado relevante, visto que demonstra uma tentativa do sistema imunológico de conter a infecção, como demonstrado por Bruns *et al.*(2010) e Röhm *et al.* (2014). Neste trabalho pode ser claramente demonstrado que neutrófilos invadiram o pulmão massivamente logo após a infecção com *A. fumigatus*, com formação de NETs.

Em vista das evidências que sugerem que o estabelecimento da aspergilose pulmonar demanda uma resposta inflamatória em que o sistema imunológico causa danos ao tecido do hospedeiro, é provável que uma resposta inflamatória elevada comprometa a capacidade do paciente para combater a infecção. O aumento da resposta inflamatória inata pode predispor tanto para infecções fúngicas ou respostas imunes desreguladas ao fungo. Além disso, o estado da imunidade inata do hospedeiro também pode contribuir significativamente para os padrões histológicos associados com infecção fúngica. Deste modo, embora a imunidade do hospedeiro seja crucial para debelar a infecção, a resposta imunológica também pode ser prejudicial e contribuir para o agravamento da doença (Carvalho *et al.*, 2012).

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.

É importante destacar que ambos os isolados foram capazes de produzir doença nos animais imunossuprimidos, e foram igualmente capazes de induzir uma resposta inflamatória intensa, que pôde ser 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 (Ben-Ami *et al.*, 2010b; Sales-Campos *et al.*, 2013; Askew *et al.*, 2014; Chotirmall *et al.*, 2014).

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir:

- Há diversidade genética entre os isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* destacando-se os isolados de *A. flavus* e *A. niger* com o uso dos marcadores (GACA)₄ e (GTG)₅, havendo agrupamentos em função da origem.
- O marcador (GTG)₅ foi o que melhor agrupou os isolados de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* em função da origem clínica ou ambiental.
- Isolados de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* são capazes de produzir melanina, com perfis químicos distintos.
- A produção de melanina por isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* não é diferente.
- Isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* produzem gliotoxina nas condições estabelecidas *in vitro*, com diferenças entre os isolados.
- Isolados clínicos e ambientais de *A. flavus* e *A. niger* não produziram gliotoxina nas condições estabelecidas *in vitro*.
- Os isolados URM3812 (isolado ambiental) e URM6753 (isolado clínico) de *A. fumigatus* produzem aspergilose pulmonar em camundongos Swiss imunossuprimidos e também danos teciduais ao hospedeiro na mesma intensidade.

REFERÊNCIAS

- Abad, A., Fernández-Molina, J.V., Bikandi, J., Ramírez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F.L., Potón, J., Garaizar, J., Rementeria, A. 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista iberoamericana de micología*, 27(4): 155-182.
- Amin, S., Thywissen, A., Heinekamp, T., Saluz, H. P., & Brakhage, A. A. 2014. Melanin dependent survival of *Aspergillus fumigatus* conidia in lung epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(5), 626-636.
- Alp, S., Arikan, S. 2008. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *Journal of Basic Microbiology*, 48:1-7.
- Al-Alawi, A.; Ryan, C.F.; Flint, J.D.; Müller, N.L. 2005. *Aspergillus*-related lung disease. *Cancer Respiratory Journal*, 12: (7) 377-387.
- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L. 2008. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4): 1244-1251.
- Araiza, J., Canseco, P., Bonifaz, A. 2006. Otomycosis: clinical and mycological study of 97 cases. *Revue de Laryngologie – Otologie - Rhinologie (Bord)*, 127: 251-254.
- Araújo, R., Amorim, A., Gusmão, L. 2012. Diversity and specificity of microsatellites within *Aspergillus* section *Fumigati*. *BMC Microbiology*, 12 (1), 154-159.
- Araújo, R., Amorim, A., Gusmão, L. 2010. Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor hospital environments. *Medical Mycology*, 48(6): 832-838.
- Araújo, R., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Amorim, A., Gusmão, L. 2009. Simple and highly discriminatory microsatellite-based multiplex PCR for *Aspergillus fumigatus* strain typing. *Clinical Microbiology and Infection*, 15 (3): 260-266.
- Araújo, R., Rodrigues, A.G. 2004. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. *Journal of clinical microbiology*, 42(9): 4335-4337.
- Armstrong-James, D., Meintjes, G., & Brown, G. D. 2014. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends in microbiology*, 22(3), 120-127.
- Askew, D.S. 2008. *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 331-337.
- Askew, D. S., Kontoyiannis, D. P., & Clemons, K. V. 2014. Advances Against Aspergillosis: Biology, Host response, Diagnosis and Treatment. *Mycopathologia*, 178(5-6), 321-324.

- Bayry, J., Beaussart, A., Dufrêne, Y. F., Sharma, M., Bansal, K., Kniemeyer, Beauvais, A. 2014. Surface structure characterization of *Aspergillus fumigatus* conidia mutated in the melanin synthesis pathway and their human cellular immune response. *Infection and immunity*, 82(8), 3141-3153.
- Baker, S.E., 2008. *Aspergillus genomics and DHN-melanin conidial pigmentation*. In: Varga, J., Samson, R.A. 2008. **Aspergillus in the genomic era**, Wageningen Academic Press, 73–82.
- Bruns, S., Kniemeyer, O., Hasenberg, M., Aimaniananda, V., Nietzsche, S. (2010). 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 Pathog* 6(4): e1000873.
- Bugli, F., Paroni Sterbini, F., Cacaci, M., Martini, C., Lancellotti, S., Stigliano, E., Posteraro, B. 2014. Increased production of gliotoxin is related to the formation of biofilm by *Aspergillus fumigatus*: an immunological approach. *Pathogens and disease*, 70(3), 379-389.
- Balajee, S.A., Gribskov, J.L., Hanley, E., Nickle, D., Marr, K.A. 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 4(3): 625–632.
- Balajee, S.A., Kano, R., Baddley, J.W., Moser, S. A., Marr, K.A., Alexander, B.D., Chiller, T. 2009. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *Journal of clinical microbiology*, 47(10): 3138-3141.
- Balajee, S.A., Marr, K.A. 2006. Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. *Future Microbiology* 1(4): 435-445.
- Balajee, S.A., Nickle, D., Varga, J., Marr, K.A. 2006. Molecular Studies Reveal Frequent Misidentification of *Aspergillus fumigatus* by Morphotyping. *Eukaryotic Cell* 10 (5): 1705–1712.
- Balloy, V., Huerre, M., Latgé, J.P., Chignard, M. 2005. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infection and immunity*, 73(1): 494-503.
- Batista, P.P., Santos, J.F., Oliveira, N.T., Pires, A.P.D., Motta, C.M.S., Luna-Alves Lima, E.A. 2008. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. *Genetics and Molecular Research*, 7: 706-717.
- Ben-Ami, R., Lewis, R.E., Leventakos, K., Kontoyiannis, D.P. 2009. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. *Blood*, 114(26): 5393-5399.
- Ben-Ami, R., Lewis, R. E., & Kontoyiannis, D. P. 2010. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *British journal of haematology*, 150(4), 406-417.
- Ben-Ami, R., Lamaris, G.A., Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P. 2010a. Interstrain variability in the virulence of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus* in a

- Toll*-deficient *Drosophila* fly model of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*, 48: 310–317.
- Brakhage, A.A., Liebmann, B. 2005. *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Medical Mycology*, 43B: S75-S82.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3): 597-601.
- Camps, S.M., Rijs, A.J., Klaassen, C.H., Meis, J.F., O’Gorman, C.M., Dyer, P.S., Melchers, W.J.G., Verweij, P.E. 2012. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates harboring the TR34/L98H azole resistance mechanism. *Journal of clinical microbiology*, 50(8): 2674-2680.
- Carvalho, A., Cunha, C., Iannitti, R. G., De Luca, A., Giovannini, G., Bistoni, F., & Romani, L. (2012). Inflammation in aspergillosis: the good, the bad, and the therapeutic. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1273(1), 52-59.
- Cerqueira, L. B., de Francisco, T. M., Gasparetto, J. C., Campos, F. R., & Pontarolo, R. 2014. Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Early Diagnosis of Aspergillosis. *PloS one*, 9(4), e92851.
- Chai, L.Y.A.; Netea, M.G.; Sugui, J.; Vonk, A.G.; Van De Sande, W.W.J.; Warris, A.; Kwon-Chung, K.J.; Kullberg, B.J. 2010. *Aspergillus fumigatus* Conidial Melanin Modulates Host Cytokine Response. *Immunobiology*, 215: 915–920.
- Chang, P.K., Yu, J., Yu, J.H. 2004. *AflT*, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion. *Fungal Genetic Biology*, 41: 911–920.
- Chotirmall, S. H., Mirkovic, B., Lavelle, G. M., & McElvaney, N. G. 2014. Immuno-evasive aspergillus virulence factors. *Mycopathologia*, 178(5-6), 363-370.
- Clemons, K.V., Stevens, D.A. 2005. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Medical Mycology*, 43(S1): 101-110.
- Cleveland, T.E., Yu, J., Fedorova, N., Bhatnagar, D., Payne, G. A., Nierman, W.C., Bennett, J.W. 2009. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in biotechnology*, 27(3): 151-157.
- Cramer, R.A., Gamcsik, M.P., Brooking, R.M., Najvar, L.K., Kirkpatrick, W.R., Patterson, T.F., Balibar, C.J., Graybill, J.R., Perfect, J.R., Abraham, S.N., et al. 2006. Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryotic Cell*, 5(6): 972-980.
- Cunha, C., Kurzai, O., Löffler, J., Aversa, F., Romani, L., & Carvalho, A. (2014). Neutrophil responses to aspergillosis: new roles for old players. *Mycopathologia*, 178(5-6), 387-393.
- Dagenais, T.R.T., Keller, N.P. 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (3): 447–465.

- Davis, D.A. 2009. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Current opinion in Microbiology*, 12(4): 365-370.
- De Valk, H.A., Klaassen, C.H.W., Méis, J.F.G.M. 2008. Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses* 51: 463–476.
- De Valk, H.A., Meis, J.F.G.M., De Pauw, B., Donnelly, P.J., Klaassen, C.H.W. 2007. Comparison of Two Highly Discriminatory Molecular Fingerprinting Assays for Analysis of Multiple *Aspergillus fumigatus* Isolates from Patients with Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1415-1419.
- Deepak, S.A., Kottapalli, K.R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K.S., Iwahashi, H., Masuo, Y., Agrawal, G.K. 2007. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current genomics*, 8(4): 234.
- El-Shanawany, A.A., Mostafa, M.E., Barakat, A., 2005. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic aspergilli toxins. *Mycopathologia*, 159: 281–289.
- Eisenman, H. C., & Casadevall, A. 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 931-940.
- Ergene, U., Akcali, Z., Ozbalci, D., Nese, N., Senol, S. 2013. Disseminated Aspergillosis due to *Aspergillus niger* in Immunocompetent Patient: a case report. *Case Reports in Infectious Diseases*, 1-3.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., Smith, T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*, 19(1): 165-256.
- Esteban, A., Su-lin, L. L., Hocking, A. D., Abarca, M. L., Cabanes, F. J., Tran-Dinh, N. 2008. Utility of microsatellite markers and amplified fragment length polymorphism in the study of potentially ochratoxigenic black aspergilli. *Current microbiology* 57 (4): 348-355.
- Fallon, J.P., Reeves, E.P., Kavanagh, K. 2011. The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes. *Microbiology*, 157(5): 1481-1488.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23): 9727-9732.
- Gardiner, D.M., Waring, P., Howlett, B.J. 2005. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology*, 151(4): 1021-1032.
- Garvey, G.S., Keller, N.P. 2010. Fungal secondary metabolites and their fundamental roles in human mycoses. *Current Fungal Infection Reports*, 4(4): 256-265.
- Gautam, A.K., Sharma, S., Avasthi, S., Bhadauria, R. 2011. Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*: An important spoilage fungi. *Research Journal of Microbiology*, 6(3): 270-280.

- Gibbons, J.G., Rokas, A. 2012. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in microbiology*, 21(1):14-22
- Godet, M., Munaut, F. 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section Flavi. *FEMS microbiology letters*, 304(2): 157-168.
- Goldenberg, S., Price, N. 2008. Opportunistic fungal lung infections. *Medicine* 36 (6): 10-18.
- Gravelat, F.N., Doedt, T., Chiang, L.Y., Liu, H., Filler, S.G., Patterson, T.F., Sheppard, D.C. 2008. In vivo analysis of *Aspergillus fumigatus* developmental gene expression determined by real-time reverse transcription - PCR. *Infection and Immunology*, 76: 3632-3639.
- Gravelat, F. N., Beauvais, A., Liu, H., Lee, M. J., Snarr, B. D., Chen, D., Sheppard, D. C. 2013. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal β -glucan from the immune system. *PLoS pathogens*, 9(8), e1003575.
- Gonçalves, R. C. R., Lisboa, H. C. F., & Pombeiro-Sponchiado, S. R. 2012. Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1467-1474.
- Guarro, J. 2011. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(7): 1447-1466.
- Guimarães, L. C. Métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos. 2011. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- Guinea, J., de Viedma, D.G., Peláez, T., Escribano, P., Muñoz, P., Meis, J. F., Klassen, C.H.W., Bouza, E. 2011. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus*: an in-depth genotypic analysis of isolates involved in an outbreak of invasive aspergillosis. *Journal of clinical microbiology*, 49(10): 3498-3503.
- Hadrich, I., Makni, F., Ayadi, A., & Ranque, S. 2010. Microsatellite typing to trace *Aspergillus flavus* infections in a hematology unit. *Journal of clinical microbiology* 48 (7): 2396-2401.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153(6): 1677-1692.
- Heinekamp, T., Thywißen, A., Macheleidt, J., Keller, S., Valiante, V., Brakhage, A.A. 2012. *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Frontiers in microbiology*, 3: 440.
- Heinekamp, T., Schmidt, H., Lapp, K., Pähitz, V., Shopova, I., Köster-Eiserfunke, N., Brakhage, A. A. 2014. Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. In *Seminars in immunopathology* (p.1-12). Springer Berlin Heidelberg.
- Hohl, T.M., Feldmesser, M. 2007. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic cell*, 6(11): 1953-1963.

- Howard, S.J., Harrison, E., Bowyer, P., Varga, J., Denning, D.W. 2011. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(10): 4802-4809.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*, 6(4): 279-284.
- Horn, B.W., Moore, G.G., Carbone, I. 2009. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 101(3): 423-429.
- Hummel, M., Spiess, B., Roder, J., Komorowski, G., Dürken, M., Kentouche, K., Laws, H.J., Mörz, M., Hehlmann, R., Buchheidt, D. 2009. 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*, 58: 1291–1297.
- Henry, T., Iwen, P.C., Hinrichs, S.H. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer; regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1510-1515.
- Jahn, B., Boukhallouk, F., Lotz, J., Langfelder, K., Wanner, G., Brakhage, A. A. 2000. Interaction of Human Phagocytes with Pigmentless *Aspergillus* Conidia. *Infection and immunity*, 68(6): 3736-3739.
- Jamieson, R.W., Wallace, W.A., Din, J.N., Raza, Z. 2011. Acute aortic occlusion with sudden paraplegia secondary to *Aspergillus niger* embolism from *Aspergillus niger* aortitis. *Journal of Vascular Surgery*, 54(5): 1472-1474.
- Johnson, G., Ferrini, A., Dolan, S. K., Nolan, T., Agrawal, S., Doyle, S., & Bustin, S. A. 2014. Biomarkers for invasive aspergillosis: the challenges continue. *Biomarkers in medicine*, 8(3), 429-451.
- Jorgensen, T.R., Park, J., Arentshorst, M., Van Welzen, A.M., Lamers, G., Van Kuyk, P.A., Damveld, R.A., Van den Hondel, C.A., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., *et al.* 2011. The molecular and genetic basis of conidial pigmentation in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(5): 544-553.
- Kamei, K., Watanabe, A. 2005. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Medical Mycology*, 43(S1): 95-99.
- Kant, S., Sanjay, S. 2007. Allergic bronchopulmonary aspergillosis mimicking as pulmonary tuberculosis. *Lung India* 24: 142-144.
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 937-947.
- Khan, A.N., Jones, C., Macdonald, S. 2003. Bronchopulmonary aspergillosis: a review. *Current Problems in Diagnostic Radiology* 32 (4):156-168.
- Klaassen, C.H.W. 2009. MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Medical Mycology*, 47 (1): 27-33.
- Klich, M.A. 2002. *Identification of common Aspergillus species*, 1st edition. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

- Kwon-Chung, K. J., & Sugui, J. A. 2013. *Aspergillus fumigatus*—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen?. *PLoS pathogens*, 9(12), e1003743.
- Kwon-Chung, K. J., & Sugui, J. A. 2008. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? *Medical mycology*, 47 (S1), S97-S103.
- Kontoyiannis, D.P. 2010. Manipulation of host angiogenesis: A critical link for understanding the pathogenesis of invasive mold infections? *Virulence*, 1(3): 192-196.
- Kousha, M., Tadi, R., Soubani, A.O. 2011. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review*, 20(121): 156-174.
- Krappmann, S., Bignell, E.M., Reichard, U., Rogers, T., Haynes, K., Braus, G.H. 2004. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional activator *CpcA* contributes significantly to the virulence of this fungal pathogen. *Molecular microbiology*, 52(3): 785-799.
- Krishnan, S., Manavathu, E.K., Chandrasekar, P.H. 2009. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses*, 52: 206–222.
- Kupfahl, C., Geginat, G., Hof, H. 2006a. Gliotoxin-mediated suppression of innate and adaptive immune functions directed against *Listeria monocytogenes*. *Medical Mycology*, 44(7): 591-599.
- Kupfahl, C., Heinekamp, T., Geginat, G., Ruppert, T., Härtl, A., Hof, H., Brakhage, A. A. 2006b. Deletion of the *gliP* gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Molecular microbiology*, 62(1): 292-302.
- Kupfahl, C., Michalka, A., Lass-Flörl, C., Fischer, G., Haase, G., Ruppert, T., Geginat, G., Hof, H. 2008. Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *International Journal of Medical Microbiology* 298: 319–327.
- Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Vaccari, E.M.H., Melo, N.T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9ªed. São Paulo: Sarvier, 1104 p.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., Brakhage, A. A. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38(2): 143-158.
- Lasker, B.A. 2002. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8): 2886–2892.
- Lewis, R.E., Wiederhold, N.P., Lionakis, M.S., Prince, R.A., Kontoyiannis, D.P. 2005a. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *Journal of clinical microbiology*, 43(12): 6120-6122.

- Lewis, R.E., Wiederhold, N.P., Chi, J., Han, X.Y., Komanduri, K.V., Kontoyiannis, D.P., Prince, R.A. 2005b. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infection and immunity*, 73(1): 635-637.
- Loussert, C., Schmitt, C., Prevost, M.C., Balloy, V., Fadel, E., Philippe, B., Kauffmann-Lacroix, C., Latgé, J.P., Beauvais, A. 2010. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular microbiology*, 12(3): 405-410.
- Mackay, I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3): 190-212.
- McCormick, A., Loeffler, J., Ebel, F. 2010. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular microbiology*, 12(11): 1535-1543.
- Menotti, J., Waller, J., Meunier, O., Letscher-Bru, V., Herbrecht, R., Candolfi, E. 2005. Epidemiological study of invasive pulmonary aspergillosis in a haematology unit by molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Hospital Infection*, 60: 61-68.
- Menzel, A.E.O., Wintersteiner, O., Hoogerheide, J.C. 1944. The isolation of gliotoxin and fumigacin from culture filtrates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biology and Chemistry*, 152: 419-429.
- Miller, M. A., Stabenow, J. M., Parvathareddy, J., Wodowski, A. J., Fabrizio, T. P., Bina, X. R., ... & Bina, J. E. 2012. Visualization of murine intranasal dosing efficiency using luminescent *Francisella tularensis*: effect of instillation volume and form of anesthesia. *PloS one*, 7(2), e31359.
- Mirhendi, H., Diba, K., Kordbacheh, P., Jalalizand, N., Makimura, K. 2007. Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR-restriction enzyme method. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 1568-1570.
- Mohapatra, S., Xess, I., Swetha, J. V., Tanveer, N., Asati, D., Ramam, M., Singh, M. K. 2009. Primary cutaneous aspergillosis due to *Aspergillus niger* in an immunocompetent patient. *Indian journal of medical microbiology*, 27(4): 367.
- Mouyna, I., Henry, C., Doering, T. L., Latgé, J.P. 2004. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS microbiology letters*, 237(2): 317-324.
- Muhammed, M., Feldmesser, M., Shubitz, L.F., Lionakis, M.S., Sil, A., Wang, Y., Glavis-Bloom, J., Lewis, R.E., Galgiani, J.N., Casadevall, A., *et al.* 2012. 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*, 3(3): 329-338.
- Müller, F.M.C., Seidler, M., Beauvais, A. 2011. *Aspergillus fumigatus* biofilms in the clinical setting. *Medical Mycology*, 49(S1): S96-S100.
- Naggie, S., Perfect, J.R. 2009. Molds: Hyalohyphomycosis, Phaeohyphomycosis, and Zygomycosis. *Clinical Chest Medicine*, 30: 337-353.

- Nakamura, H., Narihiro, T., Tsuruoka, N., Mochimaru, H., Matsumoto, R., Tanabe, Y., Hagya, K., Ikeba, K., Maruyama, A., Hanada, S. 2011. Evaluation of the aflatoxin biosynthetic genes for identification of the *Aspergillus* section Flavi. *Microbes and environments/JSME*, 26(4), 367-369.
- Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H.S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermejo, C. *et al.* 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 438: 22-29.
- Nishida, S., Yoshida, L.S., Shimoyama, T., Nunoi, H., Kobayashi, T., Tsunawaki, S. 2005. Fungal metabolite gliotoxin targets flavocytochrome b558 in the activation of the human neutrophil NADPH oxidase. *Infection and immunity*, 73(1): 235-244.
- Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*, 5(4): 203-223.
- Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. 2006. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11): 3519-3528.
- Nouri, M. A., Al-Halbosi, M. M., Dheeb, B. I., & Hashim, A. J. 2014. Cytotoxicity and genotoxicity of gliotoxin on human lymphocytes in vitro. *Journal of King Saud University-Science*.
- O’Gorman, C.M., Fuller, H.T., Dyer, P.S. 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228): 471-474.
- Okumura, Y., Ogawa, K., Nikai, T. 2004. Elastase and elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 351-354.
- Oshero, N. 2012. Interaction of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* with lung epithelial cells. *Frontiers in microbiology*, 3: 346.
- Pal, A. K., Gajjar, D. U., & Vasavada, A. R. 2014. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical mycology*, 52(1), 10-18.
- Palencia, E.R., Hinton, D.M., Bacon, C.W. 2010. The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. *Toxins*, 2(4): 399-416.
- Pasqualotto, A.C. 2009. Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Medical mycology*, 47(S1): S261-S270.
- Patterson, T.F. 2005. The future of animal models of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*, 43(S1): 115-119.

- Pel, H.J., De Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., *et al.* 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology*, 25(2): 221-231.
- Perfect, J.R. 1996. Fungal virulence genes as targets for antifungal chemotherapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(7): 1577-1583
- Person, A.K., Chudgar, S.M., Norton, B.L., Tong, B.C., Stout, J.E. 2010. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of medical microbiology*, 59(7): 834-838.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R.A. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3): 725-735.
- Pihet, M., Vandeputte, P., Tronchin, G., Renier, G., Saulnier, P., Georgeault, S., Mallet, R., Chabasse, D., Symoens, F., Bouchara, J.P. 2009. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BioMedCentral Microbiology*, 9: 177-188.
- Pitt, J.I.; Samson, R.A. 2007. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Studies in Mycology*, 59: 67–70.
- Puri, A., Ahmad, A., Panda, B.P. 2010. Development of an HPTLC-based diagnostic method for invasive aspergillosis. *Biomedical Chromatography*, 24(8): 887-892.
- Rapper, K.B., Fennel, D.I. 1977. *The genus Aspergillus*, 3rd edition. Florida: Publishing Company Malabar.
- Ray, A.C., Eakin, R.E. 1975. Studies on the biosynthesis of aspergillin by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology*, 30(6): 909-915.
- Rajendran, R., Mowat, E., McCulloch, E., Lappin, D. F., Jones, B., Lang, S., Majithiya, J.B., Warn, P., Williams, C., Ramage, G. 2011. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(5): 2092-2097.
- Rementeria, A., Lopez-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A.B., Bikandi, J., Ponton, J. Garaizar, J. 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22: 1–23.
- Rohlf, M., Albert, M., Keller N.P., Kempken, F. 2007. Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biology Letters*, 3: 523–525.
- Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N.D., Baker, S.E., Machida, M., Yu, J., Georgianna, D.R., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., *et al.* 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? *Studies in Mycology*, 59: 11–17.
- Röhm, M., Grimm, M. J., D'Auria, A. C., Almyroudis, N. G., Segal, B. H., & Urban, C. F. (2014). NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infection and immunity*, 82(5), 1766-1777.

- Rudramurthy, S. M., de Valk, H. A., Chakrabarti, A., Meis, J. F., Klaassen, C. H. 2011. High resolution genotyping of clinical *Aspergillus flavus* isolates from India using microsatellites. *PloS one* 6(1): e16086.
- Sales-Campos, H., Tonani, L., Cardoso, C. R. B., Kress, M. R. V. Z. 2013. The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. *BioMed research international*.
- Sánchez, C.D., Viña, A.L. 2004. Pulmonary Aspergillosis. *Archivos Bronconeumologia* 40 (3): 114-22.
- Santos, V. M., Dorner, J. W., & Carreira, F. 2003. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia* 156 (2), 133-138.
- Samson, R.A., Hong, S.B., Frisvad, J.C. 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44(S1): 133-148.
- Samson, R.A.; Varga, J.; Witiak, S.M.; Geiser, D.M. 2007a. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Studies in Mycology*, 59: 71–73.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J. 2007b. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59: 129–145.
- Samson, R.A., Hong, S., Peterson, S.W., Frisvad, J.C., Varga, J. 2007c. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*, 59: 147–203.
- Samson, R.A., Varga, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, 47(S1): S13-S20.
- Scharf, D.H., Heinekamp, T., Remme, N., Hortschansky, P., Brakhage, A.A., Hertweck, C. 2012. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(2): 467-472.
- Schmalzer-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., Brakhage, A. A. 2009. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*, 75(2): 493-503.
- Schumann, U., Ayliffe, M., Kazan, K., Wang, M.B. 2010. RNA silencing in fungi. *Frontiers in Biology*, 5(6): 478-494.
- Seidler, M.J., Salvenmoser, S., Müller, F.M.C. 2008. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(11): 4130-4136.
- Serrano, R., Gusmão, L., Amorim, A., Araujo, R. 2011. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. *BMC Microbiology*, 11(1): 82.
- Sheppard, D.C., Rieg, G., Chiang, L.Y., Filler, S.G., Edwards, J.E., Ibrahim, S.S. 2004. Novel Inhalational Murine Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (5): 1908–1911.

- Soleiro, C. A., Pena, G. A., Cavaglieri, L. R., Coelho, I., Keller, L. M., Dalcero, A. M., & Rosa, C. A. R. (2013). Typing clinical and animal environment *Aspergillus fumigatus* gliotoxin producer strains isolated from Brazil by PCR-RFLP markers. *Letters in applied microbiology*, 57(6), 484-491.
- Souza, P. C. Modelo experimental de imunossupressão com ciclofosfamida em *Rattus norvegicus* da linhagem wistar e primatas não humanos da espécie *Cebus apella*: análise genotoxicológica. 2011. 77 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular.
- Sundaram, C., Shantveer, G. U., Umabala, P., & Lakshmi, V. 2014. Diagnostic utility of melanin production by fungi: Study on tissue sections and culture smears with Masson-Fontana stain. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 57(2), 217.
- Svahn, K. S., Göransson, U., Chryssanthou, E., Olsen, B., Sjölin, J., & Strömstedt, A. A. 2014. Induction of Gliotoxin Secretion in *Aspergillus fumigatus* by Bacteria-Associated Molecules. *PloS one*, 9(4), e93685.
- Speth, C., Kupfahl, C., Pfaller, K., Hagleitner, M., Deutinger, M., Würzner, R., Mohsenipour, I., Lass-Flörl, C. Rambach, G. 2011. Gliotoxin as putative virulence factor and immunotherapeutic target in a cell culture model of cerebral aspergillosis. *Molecular immunology*, 48(15-16): 2122-2129.
- Staab, J.F., Balajee, S.A., Marr, K.A. 2009. *Aspergillus* section Fumigati typing by PCR-restriction fragment polymorphism. *Journal of clinical microbiology*, 47(7): 2079-2083.
- Stephens-Romero, S.D., Mednick, A.J., Feldmesser, M. 2005. The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infection and immunity*, 73(1): 114-125.
- Stevens, D.A., Melikian, G.L. 2011. Aspergillosis in the 'nonimmunocompromised' host. *Immunological investigations*, 40(7-8): 751-766.
- Sugui, J.A., Kim, H.S., Zarembek, K.A., Chang, Y.C., Gallin, J.I., Nierman, W.C., Kwon-Chung, K.J. 2008. Genes differentially expressed in conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon exposure to human neutrophils. *PLoS One*, 3(7): e2655.
- Sugui, J.A., Pardo, J., Chang, Y.C., Mullbacher, A., Zarembek, K.A., Galvez, E.M., Brinster, L., Zervas, P., Gallin, J.I., Simon, M.M., Kwon-Chung, K.J. 2007 (A). Role of *laeA* in the regulation of *alb1*, *gliP*, conidial morphology, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 6(9): 1552-1561.
- Sugui, J.A., Pardo, J., Chang, Y.C., Zarembek, K.A., Nardone, G., Galvez, E.M., Müllbacher, A., Gallin, J.I., Simon, M.M., Kwon-Chung, K.J. 2007 (B). Gliotoxin Is a Virulence Factor of *Aspergillus fumigatus*: *gliP* Deletion Attenuates Virulence in Mice Immunosuppressed with Hydrocortisone. *Eukaryotic Cell*, 6(9): 1562-1569.

- Thomas, L.M., Rand, H.K., Miller, J.L., Boyd, A.S. 2008. Primary cutaneous aspergillosis in a patient with a solid organ transplant: case report and review of the literature. *Cutis; cutaneous medicine for the practitioner*, 81(2): 127.
- Tsai, H.F., Chang, Y.C., Washburn, R.G., Wheeler, M.H., Kwon-Chung, K.J. 1998. The Developmentally Regulated *alb1* Gene of *Aspergillus fumigatus*: Its Role in Modulation of Conidial Morphology and Virulence. *Journal of bacteriology*, 180(12): 3031-3038.
- Tsai, H.F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J. 1999. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology*, 181(20): 6469-6477.
- Unis, G., Picon, P.D., Severo, L.C. 2005. Coexistência de colonização fúngica intracavitária (bola fúngica) e tuberculose ativa. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 31 (2): 139-143.
- Upadhyay, S., Torres, G., & Lin, X. 2013. Laccases involved in 1,8-dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* are regulated by developmental factors and copper homeostasis. *Eukaryotic cell* 12, 1641-1652.
- Urán, M. E., Cano, L. E. 2008. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(2): 357- 377.
- Vanhee, L.M., Nelis, H.J., Coenye, T. 2010. What can be learned from genotyping of fungi?. *Medical Mycology*, 48 (1): 60-69.
- Vallor, A.C., Kirkpatrick, W.R., Najvar, L.K., Bocanegra, R., Kinney, M.C., Fothergill, A.W., Patterson, T.F. 2008. Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(7): 2593-2598.
- Varkey, J.B., Perfect, J.R. 2008. Rare and Emerging Fungal Pulmonary Infections. *Semin. Respiratory Critical Care Medicine* 29 (2):121-131.
- Vinh, D.C., Shea, Y.R., Sugui, J.A., Parrilla-Castellar, E.R., Freeman, A.F., Campbell, J.W., Pittaluga, S., Jones, P.A., Zelazny, A., Kleiner, D., *et al.* 2009. Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clinical infectious diseases*, 49(1): 102-111.
- Vigushin, D. M., Mirsaidi, N., Brooke, G., Sun, C., Pace, P., Inman, L., Moody, C.J., Coombes, R. C. 2004. Gliotoxin is a dual inhibitor of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I with antitumor activity against breast cancer *in vivo*. *Medical Oncology*, 21 (1), 21-30.
- Volling, K., Thywissen, A., Brakhage, A. A., & Saluz, H. P. 2011. Phagocytosis of melanized *Aspergillus* conidia by macrophages exerts cytoprotective effects by sustained PI3K/Akt signalling. *Cellular microbiology*, 13(8), 1130-1148.

- Wang, X., Wadl, P. A., Wood-Jones, A., Windham, G., Trigiano, R. N., Scruggs, M., Baird, R. 2012. Characterization of Expressed Sequence Tag-Derived Simple Sequence Repeat Markers for *Aspergillus flavus*: Emphasis on Variability of Isolates from the Southern United States. *Mycopathologia* 174 (5-6): 371-382.
- Warris, A., Klaassen, C. H., Meis, J. F., de Ruiter, M. T., de Valk, H. A., Abrahamsen, T. G., Gaustad, P., Verweij, P. E. 2003. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9): 4101-4106.
- Webb, B.J., Vikram, H.R. 2010. Chronic invasive sinus aspergillosis in immunocompetent hosts: A geographic comparison. *Mycopathologia*, 170(6): 403-410.
- Wheat, J.L. 2009. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. *Clinical Chest Medicine* 30: 367-377.
- Wiemann, P., Guo, C. J., Palmer, J. M., Sekonyela, R., Wang, C. C., & Keller, N. P. (2013). Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42), 17065-17070.
- Wild, C.P., Gong, Y.Y. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31(1): 71-82.
- Wong, M.L., Medrano, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1): 75-85.
- Youngchim, S., Morris-Jones, R., Hay, R.J., Hamilton, A.J. 2004. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 175-181.
- Xavier, M.O., Oliveira, F.M., Severo, L.C. 2009. Capítulo 1 - Diagnóstico laboratorial das micoses pulmonares. Curso de Atualização - Micoses. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 35 (9): 907-919.
- Xiao-Hui Huyan, Ying-Ping Lin, Tao Gao, Rong-Yi Chen, Yi-Ming Fan. 2011. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *International immunopharmacology*, 11(9), 1293-1297.
- Zhang, C.S., Xing, F.G., Selvaraj, J.N., Yang, Q.L., Zhou, L., Zhao, Y. J., Liu, Y. 2013. The effectiveness of ISSR profiling for studying genetic diversity of *Aspergillus flavus* from peanut-cropped soils in China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50: 147-153.
- Zhao, Y., Park, S., Warn, P., Shrief, R., Harrison, E., Perlin, D.S. 2010. Detection of *Aspergillus fumigatus* in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Journal of clinical microbiology*, 48(4): 1378-138.

Zmeili, O.S., Soubani, A.O. 2007. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *Q J Med* 100: 317–334.

ANEXO



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 21 de agosto de 2014.

Ofício nº 44/2014

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 23076.032760/2014-10

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, **“Quantificação de melanina e gliotoxina, diversidade genética e expressão dos genes de virulência *Alb1/Pksp* e *Glip* em isolados de *Aspergillus*.”**

Concluimos 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: 80.

Atenciosamente,

 Prof.ª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver