

SARAH WALDSCHMIDT

Diversidade genética de isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus*: Marcadores ISSR e susceptibilidade a antifúngicos

Campo Grande - MS

2024

SARAH WALDSCHMIDT

Diversidade genética de isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus*: Marcadores ISSR e susceptibilidade a antifúngicos

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, sob
orientação do Dr. Wellington S. Fava.

Campo Grande - MS

2024

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à minha mãe, Darleni, por nunca ter medido esforços para minha educação e nunca ter me permitido desistir.

Ao meu orientador Wellington Santos Fava, mais conhecido como Weg, por fazer a experiência do TCC parecer descomplicada e prazerosa. Também ao Laboratório de Doenças Infecto-Parasitárias (LABDIP) e todos que lá trabalham, por me fornecerem a estrutura e o auxílio necessários para finalizar meu projeto.

Aos meus amigos da faculdade, especialmente Amanda e Willian, por não terem soltado a minha mão durante esses 4 anos, nos momentos bons e nos ruins; e meu amigo de infância Gustavo, por sempre me fazer lembrar o quão longe já chegamos.

E por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

*"You'll have bad times, but it'll always wake you up
to the good stuff you weren't paying attention to."*

Robin Williams, *Good Will Hunting*

Resumo

Aspergillus fumigatus é uma espécie de fungo comum que pode causar infecções graves conhecidas como aspergiloses, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. O uso crescente de fungicidas azólicos na agricultura levou ao surgimento de cepas fúngicas ambientais resistentes. O presente estudo explorou a possibilidade de se utilizar marcadores ISSR para identificar isolados de *Aspergillus fumigatus* que apresentam mutações no gene CYP51A, uma das principais responsáveis por conferir resistência a antifúngicos azólicos. Foram analisadas amostras coletadas de vários locais da América Latina, testando a resistência aos antifúngicos itraconazol, voriconazol, posaconazol e isaconazol. Embora muitas cepas apresentassem resistência, a presença de mutações no gene CYP51A, associado à resistência aos azóis, foi encontrada apenas três cepas analisadas. Isso sugere que outros mecanismos, como bombas de efluxo ou alterações em outros genes, podem contribuir para a resistência à antifúngicos. Marcadores ISSR foram usados para avaliar a diversidade genética entre as cepas. No entanto, os resultados não mostraram uma correlação clara entre os padrões ISSR e os perfis de resistência. Isso sugere que os marcadores ISSR podem não ser a ferramenta mais adequada para identificar cepas de *A. fumigatus* resistentes aos azóis.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, ISSR, antifúngicos azólicos e CYP51A.

Abstract

Aspergillus fumigatus is a common fungus that can cause severe infections known as aspergillosis, especially in immunocompromised individuals. The increasing use of azole fungicides in agriculture has led to the emergence of resistant environmental fungal strains. This study explored the possibility of using ISSR markers to identify *Aspergillus fumigatus* isolates that have mutations in the CYP51A gene, one of the main factors responsible for conferring resistance to azole antifungals. Samples collected from various locations in Latin America were analyzed, testing resistance to the antifungals itraconazole, voriconazole, posaconazole, and isavuconazole. Although many strains showed resistance, the presence of mutations in the CYP51A gene, associated with azole resistance, was found in only three of the analyzed strains. This suggests that other mechanisms, such as efflux pumps or alterations in other genes, may be contributing to antifungal resistance. ISSR markers were used to assess genetic diversity among the strains. However, the results did not show a clear correlation between ISSR patterns and resistance profiles. This suggests that ISSR markers may not be the most suitable tool for identifying azole-resistant *A. fumigatus* strains.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, ISSR, azole antifungal agents, CYP51A.

Sumário

Introdução.....	8
Gênero <i>Aspergillus</i>	8
Aspergiloses	8
Gene CYP51A e resistência a antifúngicos.....	9
Marcadores ISSR	10
Objetivo.....	11
Material e métodos	12
Coleta	12
Triagem, identificação e sequenciamento	13
Cultura e inóculo	13
Teste de suscetibilidade	14
Extração de DNA	16
Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	17
Análise.....	18
Resultados e discussão.....	19
Conclusão.....	25
Referências.....	26

Introdução

Gênero *Aspergillus*

Aspergillus é um gênero de fungos filamentosos, com cerca de 446 espécies, pertencentes à classe dos Eurotiomycetes e ao filo Ascomycota. A fase sexuada da reprodução é realizada por meio de ascósporos, enquanto a fase assexuada é realizada através de esporos assexuais chamados conídios (Campos, 2019). Não são seletivos quanto às condições do ambiente, sendo capazes de crescer em temperaturas variando de 6 a 55°C e suportar baixas umidades (Krijgsheld *et al.*, 2013). Devido ao tamanho diminuto de seus conídios, que variam de 2,5 a 3,5 micrômetros, são capazes de se dispersar facilmente pelo ar (Kermani *et al.*, 2016). Produzem hifas aéreas com conidióforos longos e vesículas terminais, sobre as quais as fiáldes produzem cadeias de conídios (Figura 1). As espécies são identificadas de acordo com as diferenças morfológicas dessas estruturas (Brooks *et al.*, 2012), sendo as mais comuns: *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus niger* Tiegh, *Aspergillus terreus* Thom e *Aspergillus nidulans* (Eidam) G.Winter.

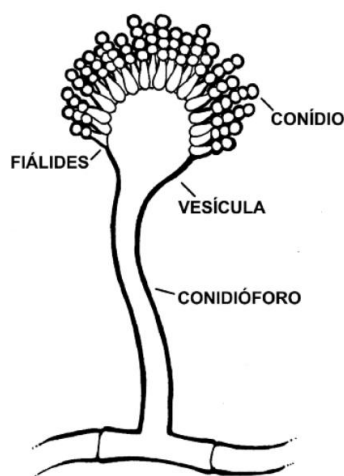


Figura 1: Micromorfologia de *Aspergillus fumigatus sensu lato*.

Fonte: Mesquita-Rocha, 2019.

Aspergiloses

Diariamente, humanos e animais inalam inúmeros conídios de *Aspergillus*, que são posteriormente eliminados pelo sistema imune sem maiores complicações (Latgé, 1999), no entanto em pacientes que apresentam algum grau de imunossupressão pode ser o causador de diversas manifestações clínicas.

Aspergilose é um termo empregado para designar um amplo número de doenças que tem como agente causador espécies do gênero *Aspergillus*, sendo a mais comum *A. fumigatus*, e é causa mais frequente de infecções pulmonares invasivas (Denardi, 2018). Com

o avanço do número de pacientes imunossuprimidos (e.g., portadores do vírus imunodeficiência humana/HIV, pacientes com câncer ou submetidos à transplantes) nas últimas décadas as aspergiloses têm se tornado cada vez mais graves e normalmente fatais, especialmente na sua forma invasiva (38-85% de mortalidade), que envolve predominantemente o trato respiratório, mas que pode disseminar para diversos órgãos como cérebro, intestino e pele (Pontes, 2018). Outras manifestações são a aspergilose pulmonar crônica, onde os conídios podem colonizar cavidades pré-existentes no pulmão, como as que ocorrem em decorrência da tuberculose, causando uma bola fúngica conhecida como aspergiloma (Meis *et al.*, 2016), e a aspergilose alérgica broncopulmonar, que causa obstrução das vias aéreas (Fortún *et al.*, 2012).

Para o tratamento das aspergiloses, são utilizados antifúngicos, sendo os triazóis os mais comuns. Voriconazol, isavuconazol e posaconazol são administrados no tratamento das formas invasivas e voriconazol ou itraconazol para formas crônicas (Arastehfar *et al.* 2021). O fluconazol não pode ser utilizado pois o gênero *Aspergillus* é intrinsecamente resistente a esta substância (Leonardelli *et al.*, 2016). Apesar da disponibilidade das drogas, um número cada vez maior de cepas resistentes a um ou mais desses compostos vêm sendo descobertas.

Gene CYP51A e resistência a antifúngicos

Os triazólicos utilizados no tratamento tem como alvo o citocromo P450, e atuam inibindo a síntese de ergosterol, maior componente da membrana celular e essencial para a integridade celular (Pontes, 2018). O citocromo P450 é codificado pelo gene CYP51A, que consiste em 2048 pares de bases no cromossomo 4 (Meis *et al.*, 2016). Mutações na região promotora do gene podem levar a diminuição da sensibilidade a estas drogas. Pacientes com aspergiloses crônicas, que fazem uso prolongado do tratamento com azóis, são os mais suscetíveis a evoluírem para formas resistentes devido à pressão seletiva das drogas. No entanto, foram encontrados espécimes resistentes no ambiente, indicando que possa haver outra rota para a aquisição de resistência (Vermeulen *et al.*, 2013).

Acredita-se que a resistência ambiental vem do uso de fungicidas azólicos na agricultura. As estruturas dos fungicidas propiconazol e bromuconazol se assemelham ao itraconazol e ao posaconazol, enquanto os fungicidas tebuconazol e epoxiconazol se assemelham ao voriconazol, além de utilizarem o mesmo mecanismo de ação, tendo como alvo o gene CYP51A (Resendiz-Sharpe *et al.*, 2021). A intensa pressão seletiva exercida pelos pesticidas sobre as populações fúngicas pode favorecer o desenvolvimento de resistência. Ren *et al.* (2017) conseguiram demonstrar que a exposição de *A. fumigatus* a fungicidas azólicos induziu mutações no gene CYP51A e a consequente conferência de resistência à antifúngicos utilizados para tratamento clínico.

Marcadores ISSR

ISSR, ou Inter-Simple Sequence Repeat (Inter Repetições de Sequências Simples) são marcadores moleculares que baseiam-se na amplificação de fragmentos entre regiões de DNA repetitivo (Silva *et al.*, 2013). A amplificação é feita por um único primer, construído a partir da sequência de microssatélites contendo de 16 a 20 pares de bases (Faleiro, 2007). Os marcadores ISSR foram introduzidos em 1994 para estudos em cultivares, no entanto, seu uso vem crescendo desde então, expandindo também para animais e fungos (Wolfe, 2005). Sua utilização para análises genéticas tem se mostrado vantajosa, pois não exige conhecimento prévio do genoma da espécie alvo (Costa *et al.*, 2015) e é capaz de superar as dificuldades enfrentadas por outros marcadores, como a baixa reprodutibilidade do RAPD (Random amplification polymorphic DNA - DNA polimórfico amplificado aleatoriamente), o alto custo do AFLP (amplification fragment length polymorphism - polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) e a complexidade do SSR (simple sequences repeat -repetição de sequência simples) (Al-Hadeithi, 2015).

Este método também já foi descrito como uma ferramenta para diferenciar espécies e linhagens de fungos (Zhang *et al.*, 2013) e vem sendo empregada especialmente em estudos com *Aspergillus flavus* (Hatti *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2008), sem muitas informações sobre sua aplicação em outras espécies do gênero.

Objetivo

Este trabalho utilizou dados gerados de um projeto maior que envolveu a identificação de isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus* resistentes a compostos azólicos em vários locais da América Latina, e o objetivo principal foi analisar a eficácia dos marcadores genéticos do tipo ISSR na identificação dos isolados que apresentavam mutações no gene CYP51A, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência aos azóis e potencialmente auxiliando no desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes.

Material e métodos

Coleta

As amostras utilizadas neste trabalho foram provenientes do projeto LatAsp (Pesquisa Latino-Americana de Resistência aos Azóis em *Aspergillus fumigatus*). Utilizando um protocolo padronizado de ciência cidadã, foram coletadas 6.954 amostras de *Aspergillus fumigatus* em 11 países da América Latina (com exceção da Venezuela devido a restrições políticas). A coleta consistiu na exposição de tiras adesivas ao ar ambiente por aproximadamente 10 horas, em quatro diferentes momentos, entre julho de 2022 e agosto de 2023. Os voluntários foram orientados a coletar as amostras sempre no mesmo local, garantindo a comparabilidade dos dados. Após a coleta, as amostras foram identificadas e enviadas aos laboratórios para as análises microbiológicas (Figura 2)

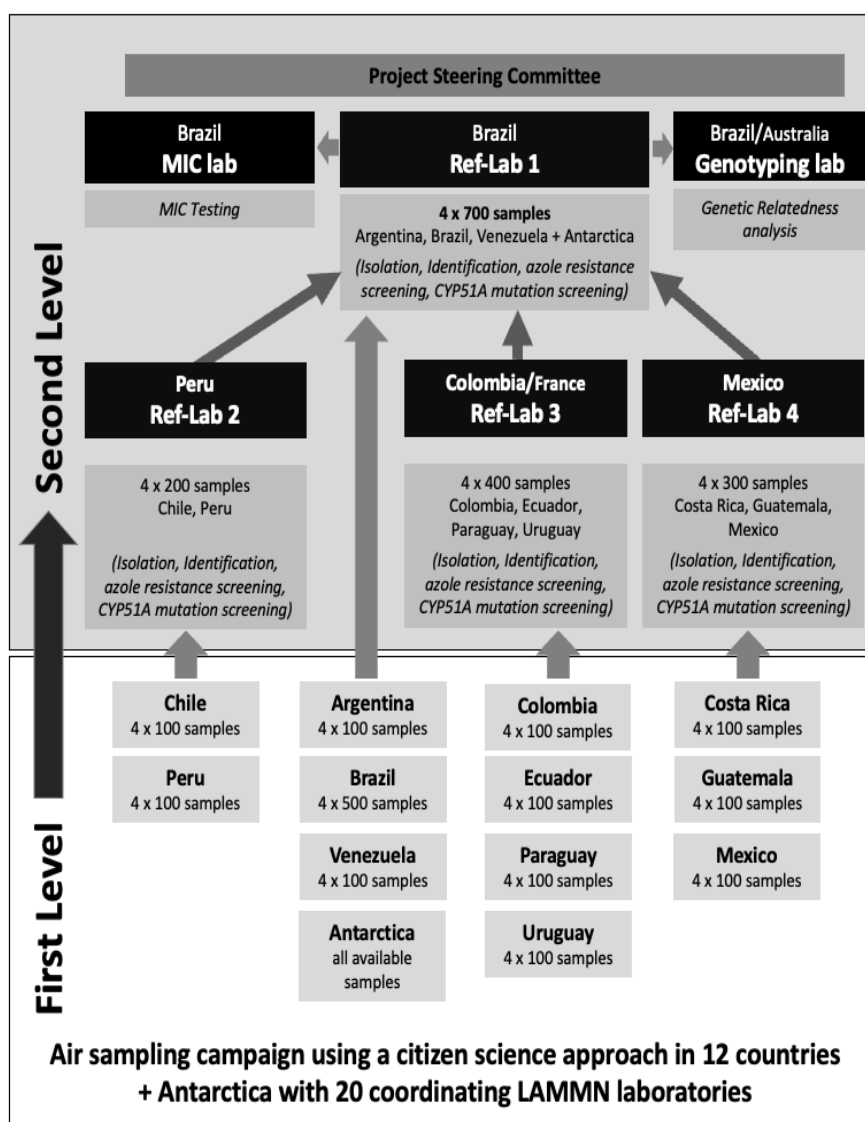


Figura 2: Fluxograma do projeto.

Fonte: Relatório final do LatAsp, 2024 (Comunicação pessoal Dr. Wellington Santos Fava)

Triagem, identificação e sequenciamento

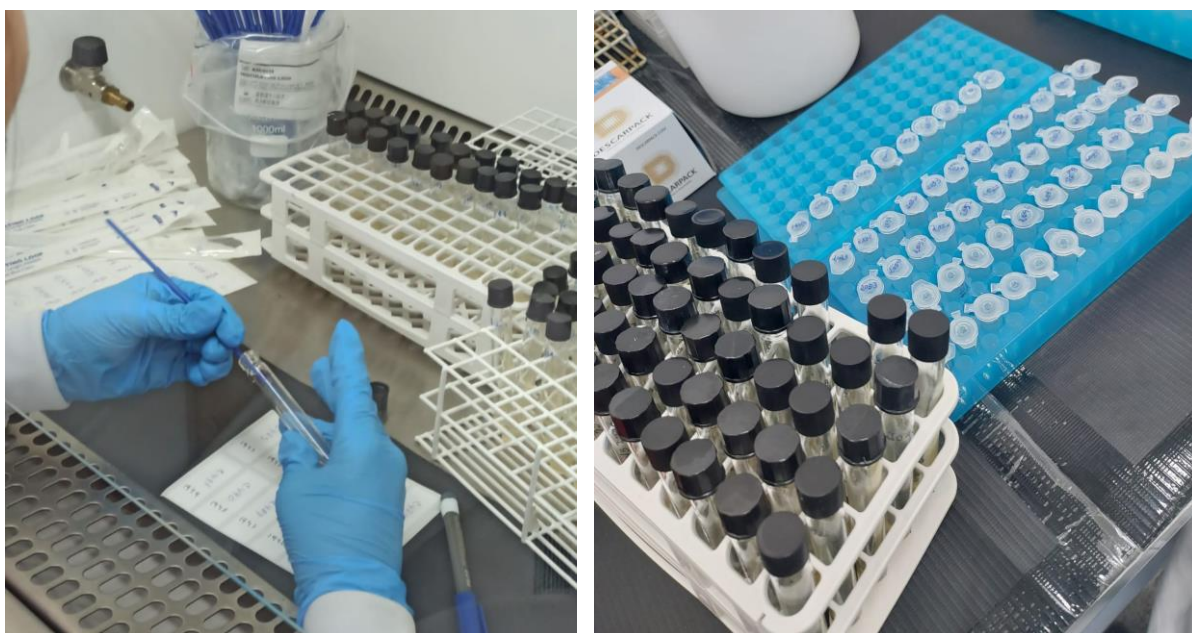
As amostras foram enviadas a laboratórios parceiros no Brasil, Peru, Colômbia e México, isoladas e identificadas a nível de espécie pela espectrometria de massas de MALDI-TOF ou pelo sequenciamento do gene da beta-tubulina, no caso das espécies crípticas (seção Fumigati).

Nas amostras que demonstraram crescimento no teste de triagem, foi realizado também o sequenciamento genético do gene CYP51A para investigação de mutação ou inserção de *tanden repeat*.

Cultura e inóculo

Para este trabalho, foram selecionadas 23 isolados de *A. fumigatus* e inoculados a partir da tira adesiva em um tubo com meio ágar batata inclinado. O procedimento foi realizado em uma cabine de fluxo laminar com o auxílio de uma alça estéril descartável (Figura 3). Os tubos foram mantidos em estufa com temperatura constante de 37°C durante 48 horas.

Após o tempo na estufa, com auxílio de um swab, foi preparada uma suspensão de conídios com concentração equivalente à escala McFarland 0.5 em água destilada com NaCl (Figura 4). Este inóculo foi utilizado para o teste de triagem.



Figuras 3 (esquerda) e 4 (direita): Repique dos isolados em tubos e preparação dos inóculos, respectivamente.

Fonte: A autora.

Teste de suscetibilidade

Para identificação dos indivíduos resistentes aos antifúngicos azóis foi realizado um teste de triagem, no qual foi inoculado 20 µL da solução de esporos em uma placa de ágar RPMI 2% dextrose com antifúngicos solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos até as concentrações de 4 mg/L para Itraconazol, 2 mg/L para Voriconazol e 0,5 mg/L para Posaconazol, e um poço para controle de crescimento positivo sem adição de antifúngicos (Figura 5). As placas foram incubadas a 37°C e a leitura realizada após 48 horas. O crescimento de colônias foi classificado para cada isolado e poço (itraconazol, voriconazol, posaconazol e poço de controle), de acordo com Arendrup *et al.* (2017) e Buil *et al.* (2017), da seguinte forma: 0, nenhum crescimento visível; 1, crescimento fraco, apenas, no ponto onde o ágar foi inoculado; 2, crescimento menor do que aquele observado no poço controle positivo; 3, crescimento não inibido, semelhante ao do poço controle positivo. Os isolados foram classificados em resistentes (quando apresentaram escala de crescimento 1, 2 ou 3) ou sensíveis (quando apresentaram escala 0 de crescimento)

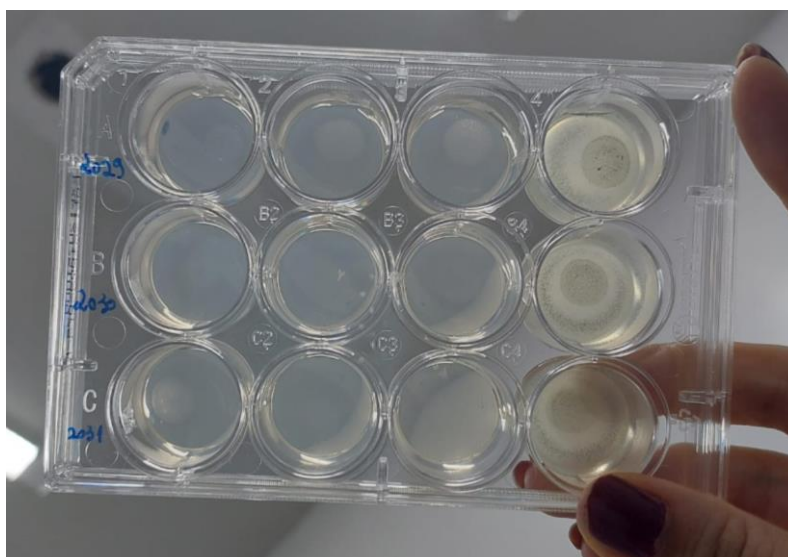


Figura 5: Placa de triagem com controle positivo à direita.

Fonte: A autora.

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) foi feita pela técnica de microdiluição seriada, seguindo o protocolo norte-americano CLSI (2022), em placas de microdiluição de 96 poços com fundo em “U”. Foram testados apenas os isolados que foram capazes de crescer no teste de triagem.

Os antifúngicos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em RPMI 1640. As concentrações finais variaram de 16 a 0,03 mg/L (Tabela 1). As diluições foram realizadas dos poços 2 a 11, sendo os poços 1 e 12 selecionados para o controle negativo e positivo, respectivamente.

Tabela 1: Sequência de diluições e concentrações dos antifúngicos no teste de susceptibilidade

	Concentração (mg/L)	Fonte	Volume de AF (µL)	Volume de DMSO (µL)	Concentração Intermediária (mg/L)	Volume do AF diluído para 1:100 (µL)	Volume de RPMI para diluição 1:100 (µL)	Concentração (mg/L) após diluição 1:100 com RPMI	Concentração (mg/L) após diluição 1:2 com inóculo
Passo 1	3200	Solução mãe	200	0	3200	100	9900	32	16
Passo 2	3200	Solução mãe	100	100	1600	100	9900	16	8
Passo 3	3200	Solução mãe	50	150	800	100	9900	8	4
Passo 4	3200	Solução mãe	50	350	400	100	9900	4	2
Passo 5	400	Passo 4	100	100	200	100	9900	2	1
Passo 6	400	Passo 4	50	150	100	100	9900	1	0,5
Passo 7	400	Passo 4	50	350	50	100	9900	0,5	0,25
Passo 8	50	Passo 7	100	100	25	100	9900	0,25	0,125
Passo 9	50	Passo 7	50	150	12.5	100	9900	0.125	0,06
Passo 10	50	Passo 7	25	175	6.25	100	9900	0.0625	0,03

A leitura foi realizada após 48 horas com o auxílio de um espelho de leitura (Figura 6). Para determinação do MIC foi comparado o crescimento fúngico dos poços alvo com os controles positivos e negativos.

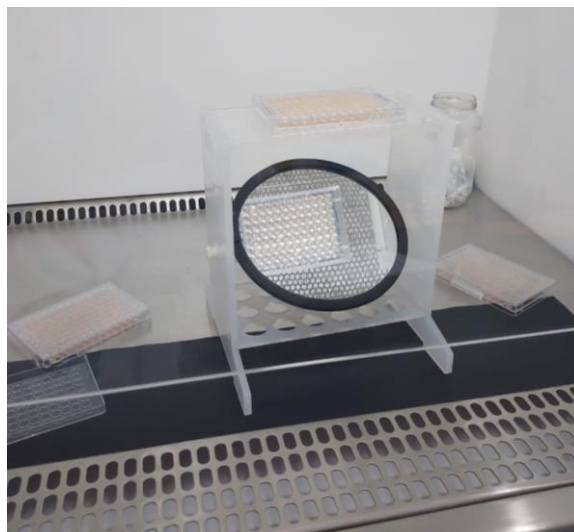


Figura 6: Espelho de leitura das placas do teste de suscetibilidade.

Fonte: A autora

Extração de DNA

Para extração do DNA, as amostras foram adicionadas a microtubos de 2mL com beads de zircônio e 200 µl de água ultrapura, e maceradas em um macerador automático em três ciclos de maceração por 60 segundos a uma velocidade de 4000x, com intervalos de 30 segundos, seguido de um spin de 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 500 µl de tampão de extração contendo 1mM de EDTA, 10 mM de Tris (pH 8,0), 1% de SDS, 2 % de Triton X-100 e 100 nM de NaCl (Sepúlveda *et al.*, 2017), e 20 µl de Proteinase-K. As amostras foram então submetidas a agitação em vortex por 30 segundos e incubadas a 65°C por 1 hora em termobloco com agitação, seguido de um spin de 15 segundos.

Posteriormente, 500 µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados, seguido agitação em vórtex por 30 segundos. Após a agitação, a solução foi submetida à centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante transferido para um microtubo de 1,5mL contendo 500 µL de isopropanol e 50 µL de Acetato de amônio 3M e homogeneizado gentilmente por inversão. O produto obtido foi mantido em freezer a -20°C *overnight*.

No dia seguinte, os microtubos de 1,5 mL foram centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos, desprezando o sobrenadante e mantendo o pellet. A seguir, 500 µL de etanol 70% foram adicionados e os microtubos foram novamente centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante e mantendo o pellet. Os microtubos foram então

mantidos abertos em um termobloco a 37°C até que todo o etanol fosse evaporado. Por fim, foram eluídos com 100 µL de água ultrapura e a amostra foi armazenada em freezer a -20°C para uso imediato ou em freezer a -80°C para uso a longo prazo.

Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A região dos microssatélites do DNA foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers para ISSR da British Columbia University Biotechnology Laboratory (UBCBL). Diversos primers foram testados, porém apenas 5 amplificaram com sucesso a região alvo, sendo estes os utilizados no presente trabalho (Tabela 2).

Tabela 2: Primers ISSR utilizados e sua sequência de nucleotídeos.

Primer	Sequência
UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC888	CAC ACA CAC ACA CAB DB
UBC889	ACA CAC ACA CAC ACA CDB D

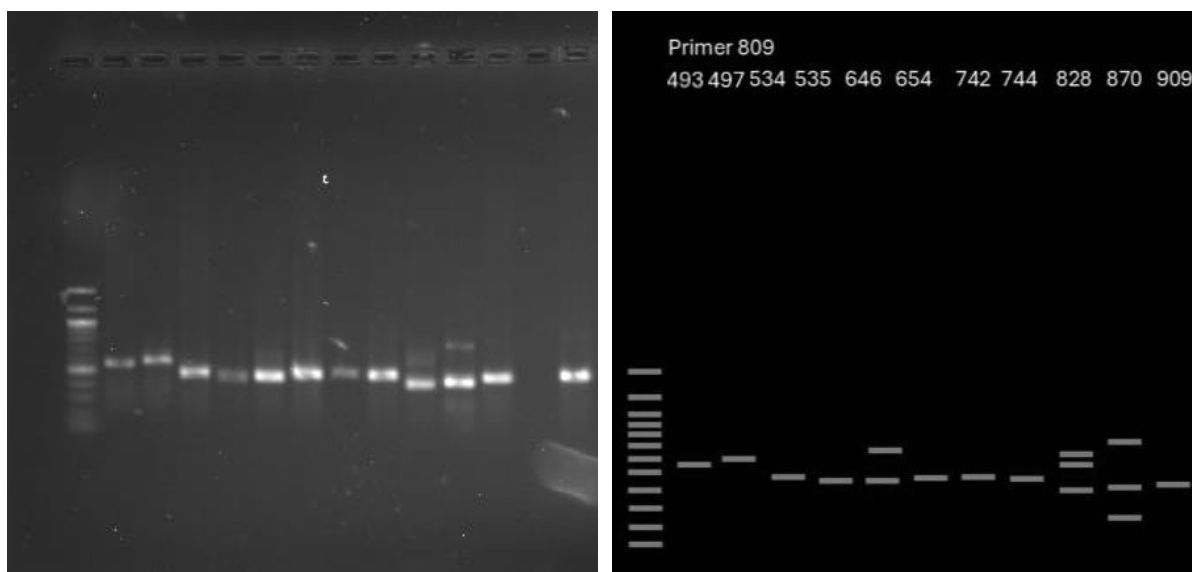
Cada reação foi feita utilizando o 7,8 µL Master mix(Thermo-Fisher Scientific), 2 µL de DNA e 0,5µL de primer, 0,5 µL de DMSO 5% e 0,2 µL de BSA 5ug/uL. A PCR foi amplificada em termociclador durante um período de 2h30, cujas etapas estão descritas na Tabela 3 abaixo. Os resultados foram observados por meio de eletroforese com coloração GelRed em gel de agarose a 2%, utilizando como guia um marcador de 100pb. Os géis correram por 1h a 400mA e 90V, e foram visualizados em luz UV no Gel Doc XR+ Bio Rad.

Tabela 3: Descrição das etapas da PCR.

Etapas	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (hh:mm:ss)
Desnaturação Inicial	1	94	00:04:00
Desnaturação		94	00:01:00
Anelamento	45	50	00:00:45
Extensão		72	00:02:00
Extensão final	1	72	00:07:00

Análise

As imagens da eletroforese foram tratadas no programa Image Lab e exportadas, onde as bandas foram transformadas em barras correspondentes (Figuras 7 e 8) que foram posteriormente analisadas no software PyElph 1.4 para a determinação do tamanho dos fragmentos. Por fim, os resultados foram exportados para o software PAST, onde foi realizado o teste de similaridade de Jaccard, cujos resultados foram utilizados para a elaboração de um dendograma que permitisse a visualização do agrupamento das amostras.



Figuras 7 (esquerda) e 8 (direita): Visualização do gel de eletroforese e sua representação em barras, respectivamente.

Fonte: A autora

Resultados e discussão

No teste de triagem, apenas 5 isolados (22%) tiveram seu crescimento completamente inibido pelo Itraconazol, recebendo 0 na escala, enquanto para os antifúngicos voriconazol e posaconazol, o crescimento foi inibido em sua quase totalidade, com 87% das amostras em ambos os casos. Quatro amostras não apresentaram crescimento em nenhum dos 3 poços (Tabela 4).

No teste de microdiluição, o antifúngico Itraconazol apresentou o maior número de amostras com MIC considerável. Tendo como base os valores de *epidemiologic cutoff* (ECOFF) dos antifúngicos citados na literatura (Guinea, 2020), sendo suscetível $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$, intermediário = $1 \mu\text{g/mL}$ e resistente $\geq 2 \mu\text{g/mL}$, 58% das amostras apresentaram algum nível de resistência, com 31,5% exibindo uma concentração inibitória mínima extremamente alta, de $16 \mu\text{g/mL}$. O maior valor de MIC alcançado no teste com Voriconazol foi $2 \mu\text{g/mL}$, com apenas 2 amostras apresentando crescimento nessa concentração. No entanto, apenas 4 amostras (21%) apresentaram um MIC menor ou igual a $0,5 \mu\text{g/mL}$, o que demonstra que a maioria das amostras podem ser consideradas resistentes, apesar de não apresentarem concentrações inibitórias tão altas. Para o Isavuconazol, 8 amostras (42%) demonstraram MICs que os classificam como sensíveis, e 2 (10%) apresentaram concentrações inibitórias mais altas, sendo essas 4 e $16 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 4).

O Posaconazol apresentou ECOFFs citados na literatura que diferem dos anteriores, sendo que amostras com concentrações inibitórias mínimas maiores que $0,25 \mu\text{g/mL}$ já são consideradas resistentes. Desse modo, 10 amostras (52,5%) apresentaram MICs que as colocam na categoria de resistente, e 5 (26%) ficaram na categoria indeterminado (MIC = $0,25 \mu\text{g/mL}$).

Apesar de 19 isolados apresentarem fenótipo de resistência em ambos os testes, apenas três possuíam mutações no gene CYP51A (Tabela 4). Os isolados mutantes apresentaram MICs elevados para itraconazol, corroborando com a literatura. No entanto, o indivíduo 1007 que apresenta o maior número de mutações, não demonstrou tolerância aumentada aos antifúngicos quando submetido aos testes de triagem e susceptibilidade. A mutação G54R, encontrada em 2 isolados (646 e 1228) havia sido anteriormente registrada apenas em amostras clínicas, especialmente em pacientes tratados com antifúngicos azólicos por um longo período (Meis *et al.*, 2016), sendo este o primeiro registro para amostras ambientais. Esta descoberta alerta para o aumento da prevalência de indivíduos multi-resistentes, uma vez que ambos os isolados mostraram concentrações inibitórias altas tanto para Itraconazol quanto para Posaconazol.

Tabela 4. Isolados de *Aspergillus fumigatus* (n = 23) utilizados neste trabalho e os resultados dos testes de triagem, microdiluição e presença de mutações no gene CYP51A. Os isolados com asterisco (*) foram analisados quanto ao perfil genético utilizando marcadores do tipo ISSR.

ID	Pais de origem	ITZ 4 mg/L	VOZ 2 mg/L	POZ 0.5 mg/L	MIC ISZ	MIC ITZ	MIC POZ	MIC VOZ	Mutação no gene CYP51A
1455	ARGENTINA	0	0	0	-	-	-	-	sensível
1456	ARGENTINA	0	0	0	-	-	-	-	sensível
1459	ARGENTINA	0	0	0	-	-	-	-	sensível
1460	ARGENTINA	0	0	0	-	-	-	-	sensível
1007	BRAZIL	1	0	0	2	1	0.25	1	F46Y/M127V/N248T/D255E/E427K
646*	COSTA RICA	3	0	3	0.125	16	1	0.5	G54R
654*	COSTA RICA	0	2	0	2	16	1	1	nenhuma
744*	COSTA RICA	3	0	0	2	0.25	0.06	2	nenhuma
1165	COSTA RICA	1	1	1	2	0.5	0.5	1	nenhuma
1211	COSTA RICA	1	1	1	2	0.5	0.125	1	nenhuma
742*	COSTA RICA	2	0	0	2	0.25	0.06	1	nenhuma
828*	GUATEMALA	1	0	0	0.5	2	0.5	0.5	nenhuma
870*	GUATEMALA	1	0	0	2	1	0.25	1	nenhuma
909*	GUATEMALA	3	0	0	0.25	16	0.5	1	P216L
910*	GUATEMALA	2	0	0	0.25	16	1	0.5	nenhuma
914	GUATEMALA	1	0	0	4	1	0.5	1	nenhuma
917	GUATEMALA	1	0	0	2	0.5	0.25	1	nenhuma
975	GUATEMALA	2	0	0	16	0.25	0.5	1	TR34/L98H/S297T/F495I
493*	MEXICO	3	0	0	0.5	0.25	0.25	2	nenhuma
497*	MEXICO	3	0	0	0.25	16	0.25	1	F219I
534*	MEXICO	1	0	0	2	1	0.5	1	nenhuma
535*	MEXICO	1	0	0	0.5	0.5	0.125	2	nenhuma
1228	MEXICO	2	0	0	0.125	16	2	0.5	G54R

ISZ: Isavuconazol; ITZ: Itraconazol; POZ: Posaconazol; VOZ: Voriconazol.

A maior parte dos indivíduos de *A. fumigatus* resistentes, tanto de espécimes clínicos quanto ambientais, possuem as mutações L98H e TR34, consistindo numa alteração de Leucina para Histidina na posição 98 e uma sequência de 34 pares de bases duplicada na região promotora do gene (Gonçalves, 2017). A presença da sequência TR tem sido demonstrada como indutora da superexpressão do gene CYP51A, aumentando a interação da proteína de ligação ao elemento regulador de esterol, resultando em maior tolerância aos azóis (Meis *et al*, 2016). Um trabalho de Ren e colaboradores (2017) demonstrou que a presença adicional das mutações S297T e F495I resultou em uma modulação do perfil de resistência, com redução da resistência ao voriconazol em comparação aos isolados portando exclusivamente as mutações TR34 e L98H, o que pode explicar o valor de MIC intermediário para voriconazol encontrado no isolado 975. A literatura não reporta isolados com essas mutações que tenham demonstrado sensibilidade ao itraconazol, no entanto neste presente estudo o indivíduo portador recebeu escala 2 no teste de triagem e demonstrou um MIC de 0,250 para este antifúngico.

A identificação de isolados resistentes sem mutações em CYP51A corrobora estudos prévios, indicando a existência de mecanismos alternativos de resistência aos azóis. Buied e colaboradores (2012) identificaram que 43% dos isolados resistentes analisados não apresentavam mutações no gene CYP51A. Em consonância com os resultados de Tashiro e colaboradores (2010), que identificaram alta prevalência de resistência ao voriconazol em isolados sem mutações em CYP51A, nossos dados demonstram que todos os isolados tolerantes a este antifúngico, em nosso estudo, também não apresentavam alterações nesse gene, o que destaca a necessidade a investigação de outros mecanismos de resistência.

Apesar de haver alguns estudos que buscam encontrar outros mecanismos de resistência nas espécies do gênero *Aspergillus* no geral, até o momento nenhum foi comprovado. No entanto alguns autores acreditam que a resistência em espécimes sem mutações pode ser explicada por ação de bombas de efluxo, medidas pelos transportadores ABC e MFS (Pérez-Cantero *et al.*, 2020) ou pela superexpressão do gene CYP51B (Buied *et al*, 2012).

Após a extração de DNA das 23 amostras e a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), apenas 12 amostras apresentaram um produto de PCR visível por eletroforese em gel de agarose. A ausência de bandas nas demais amostras (Figura 9) sugere a falha da amplificação do DNA alvo. Dessa forma, a análise subsequente foi restrita às 12 amostras com resultados positivos para a PCR.

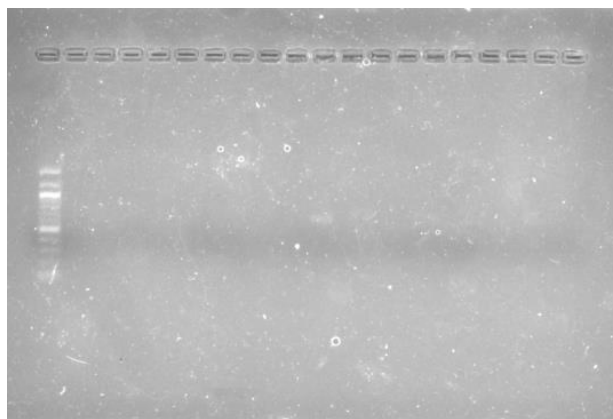


Figura 9: Visualização do gel de eletroforese sem nenhuma banda visível.

Fonte: A autora.

As amostras analisadas neste estudo foram coletadas em três países da América Central: México, Guatemala e Costa Rica (Figura 10). A agricultura representa uma parcela significativa da economia desses países, impulsionando o uso intensivo de pesticidas, incluindo fungicidas azólicos. O México, por exemplo, destaca-se pelo alto uso de fungicidas, representando 4% do uso mundial (Resendiz-Sharpe *et al.*, 2021). Na Costa Rica, a cultura da banana, fundamental para a exportação, envolve um protocolo de aplicação de fungicidas que inclui múltiplas aplicações de azóis (Brühl *et al.*, 2023). Na Guatemala, o uso inadequado e em excesso de pesticidas, principalmente de forma profilática, resulta em uma dispersão significativa desses produtos no ambiente (Arbona, 1998).



Figura 10: Mapa da origem dos isolados.

Fonte: A autora.

Por fim, foi elaborado um dendograma (Figura 11). Para melhor visualização do resultado, foi colocada a mutação do gene CYP51A da amostra junto ao ID de trabalho.

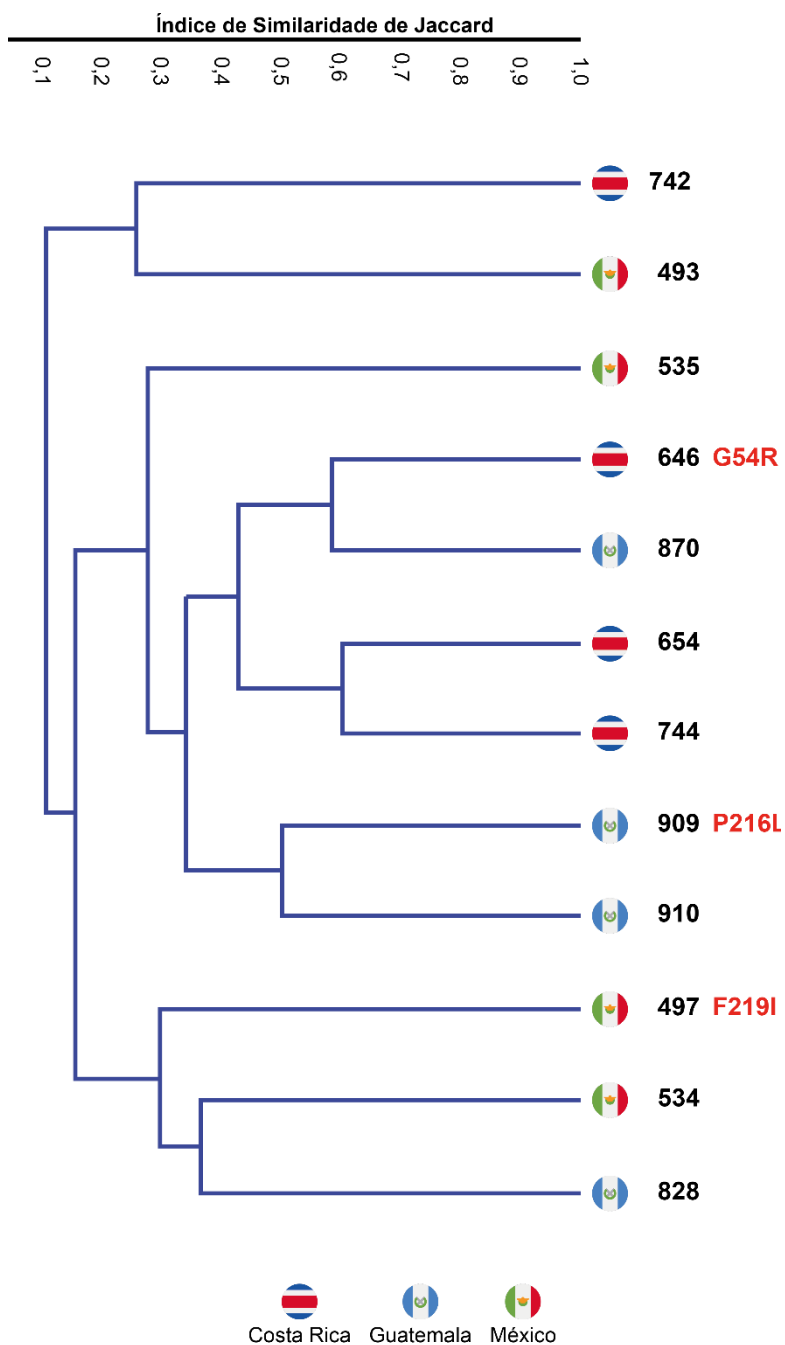


Figura 11: Dendrograma de similaridade entre isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus* baseados no perfil genético de marcadores ISSR.

Fonte: A autora.

A ausência de correlação entre o dendrograma e a distribuição geográfica de *A. fumigatus* pode ser atribuída à sua alta capacidade de dispersão. A produção de conídios diminutos e leves permite que este fungo seja transportado por longas distâncias pelo ar (Gonçalves, 2017), dificultando a delimitação de populações geograficamente estruturadas.

Além disso, a presença do ciclo sexual em *A. fumigatus* sugere um alto grau de panmixia global (Meis *et al.*, 2016), ou seja, um intenso fluxo gênico entre populações distantes, o que pode homogeneizar a variabilidade genética da espécie em escala global. Ademais, estudos mostram que testes de similaridade feitos com marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA) possuem resultados melhores aos feitos com marcadores ISSR quando se trata de relações geográficas (Rassin *et al.*, 2015).

Além do não agrupamento geográfico, os isolados que apresentam mutações no gene CYP51A (497, 646 e 909) não formaram um agrupamento claro, sendo a maior similaridade de 0.35. Os marcadores ISSR são altamente polimórficos (Rassin *et al.*, 2015), sendo que essa variabilidade pode dificultar a associação direta entre um determinado padrão de bandas e a resistência a um antifúngico específico. Além disso, a confiabilidade e reprodutibilidade do método dependem diretamente do número de loci e bandas analisados (Ng & Tan, 2015), o que pode ter sido um grande empecilho neste presente trabalho.

Conclusão

Os marcadores ISSR não demonstraram aplicabilidade na identificação de isolados de *Aspergillus fumigatus* resistentes à antifúngicos azólicos. Embora muitas cepas apresentassem resistência, mutações no gene CYP51A, associadas à resistência aos azóis, foram encontradas em apenas três das cepas analisadas. Isso sugere que outros mecanismos, como bombas de efluxo ou alterações em outros genes, podem estar contribuindo para a resistência aos antifúngicos. Os marcadores ISSR foram utilizados para avaliar a diversidade genética entre as cepas, mas os resultados não mostraram uma correlação clara entre os padrões ISSR e os perfis de resistência. Portanto, os marcadores ISSR podem não ser a ferramenta mais adequada para identificar cepas de *A. fumigatus* resistentes aos antifúngicos azóis.

Referências

A formatação das referências bibliográficas seguiu as regras de formatação da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT NBR 6023/2018.

- AL-HADEITHI, Z. Using ISSR markers to build a phylogenetic of Barley Genotypes. **Journal of Science**, v. 56, n. 2C, p. 1682–1688, 2015.
- ARASTEHFAR, A.; CARVALHO, A.; HOUBRAKEN, J.; LOMBARDI, L.; GARCIA-RUBIO, R.; JENKS, J. D.; *et al.* *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. **Studies in Mycology**, v. 100, p. 100115, set. 2021.
- ARBONA, S. I. Commercial Agriculture and Agrochemicals in Almolonga, Guatemala. **Geographical Review**, v. 88, n. 1, p. 47–63, 1 jan. 1998.
- ARENDRUP, Maiken Cavling *et al.* Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3325–3333, 2017.
- BATISTA, P. P.; SANTOS, J. F.; OLIVEIRA, N. T.; PIRES, A. P. D.; MOTTA, C. M. S.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 706–717, 2008.
- BROOKS, G. F.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A.; *et al.* **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- BRÜHL, C. A.; ARIAS ANDRES, M.; ECHEVERRÍA-SÁENZ, S.; BUNDSCHUH, M.; KNÄBEL, A.; MENA, F.; *et al.* Pesticide use in banana plantations in Costa Rica – A review of environmental and human exposure, effects and potential risks. **Environment International**, v. 174, p. 107877, 1 abr. 2023.
- BUIED, A.; MOORE, C. B.; DENNING, D. W.; BOWYER, P. High-level expression of *cyp51B* in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 3, p. 512–514, 2 dez. 2012.
- BUIL, J. B. *et al.* Single-center evaluation of an agar-based screening for azole resistance in *Aspergillus fumigatus* by using VIPcheck. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 12, p. 10.1128/aac. 01250-17, 2017.
- CAMPOS, Carlos Alberto Passinho. Fungicidas agrícolas azólicos e pressão seletiva de fenótipos resistentes em *Aspergillus fumigatus*. 2019.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. 2022. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. **CLSI supplement M38M51S**. Clinical and Laboratory Institute, Wayne, PA.
- COSTA, D. F. D.; VIEIRA, F. D. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. D. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970–976, dez. 2015.

- DENARDI, L. B. *Aspergillus* spp.: **suscetibilidade aos antifúngicos isolados e em associação por diferentes metodologias e detecção de mecanismos de resistência a azólicos**. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa, 2007.
- FORTÚN, J.; MEIJE, Y.; FRESCO, G.; MORENO, S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 4, p. 201–208, 1 abr. 2012.
- GONÇALVES, S. Global Aspects of Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* with Focus on Latin American Countries. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 5, 10 fev. 2017.
- GUINEA, J. Updated EUCAST Clinical Breakpoints against *Aspergillus*, Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 343, 6 dez. 2020.
- HATTI, A. D.; TAWARE, S. D.; TAWARE, A. S.; PANGRIKAR, P. P.; CHAVAN, A. M.; MUKADAM, D. S. Genetic diversity of toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strains using ISSR markers. **International Journal of Current Research**, v. 5, p. 061-066, 2010.
- KERMANI, Firoozeh *et al.* Diversity, molecular phylogeny and fingerprint profiles of airborne *Aspergillus* species using random amplified polymorphic DNA. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-10, 2016.
- KRIJGSHELD, P. *et al.* Development in aspergillus. **Studies in mycology**, v. 74, n. 1, p. 1-29, 2013.
- LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310–350, 1 abr. 1999.
- LEONARDELLI, F.; MACEDO, D.; DUDIUK, C.; CABEZA, M. S.; GAMARRA, S.; GARCIA-EFFRON, G. *Aspergillus fumigatus* Intrinsic Fluconazole Resistance Is Due to the Naturally Occurring T301I Substitution in CYP51A_p. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5420–5426, 1 set. 2016.
- MEIS, J. F.; CHOWDHARY, A.; RHODES, J. L.; FISHER, M. C.; VERWEIJ, P. E. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, p. 20150460, 5 dez. 2016.
- MESQUITA-ROCHA, Sabrina. *Aspergillus fumigatus*: aspectos gerais e importância na medicina contemporânea. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 37, n. 2, p. 169-173. 2019, 2019.
- NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. **ASM Science Journal**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.
- PÉREZ-CANTERO, A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, L.; GUARRO, J.; CAPILLA, J. Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 1, p. 105807, 1 jan. 2020.

- PONTES, L. **Vigilância de resistência frente a antifúngicos azólicos de isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus***. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- RASSIN, N. K.; AL-JUDY, N.; DHEEB, B. Molecular Identification of *Aspergillus fumigatus* Using ISSR and RAPD Markers. **Iraqi Journal of Science**, v. 56, n. 4A, p. 2788–2797, 2015.
- REN, J.; JIN, X.; ZHANG, Q.; ZHENG, Y.; LIN, D.; YU, Y. Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. **Journal of Hazardous Materials**, v. 326, p. 54–60, mar. 2017.
- RESENDIZ-SHARPE, A.; DEWAELE, K.; MERCKX, R.; BUSTAMANTE, B.; VEGA-GOMEZ, M. C.; ROLON, M.; *et al.* Triazole-Resistance in Environmental *Aspergillus fumigatus* in Latin American and African Countries. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 292, 1 abr. 2021.
- SEPÚLVEDA, Victoria E. *et al.* Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. **MBio**, v. 8, n. 6, p. 10.1128/mbio.01339-17, 2017.
- SILVA, M. R. da; OLIVEIRA, M. do S. P. de; MOURA, E. F.; RODRIGUES, S. de M. Seleção de primers ISSR para uso em genomas de camucamuzeiro. In: **17º Seminário de Iniciação Científica e 1º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental**, Belém-PA, 2013.
- TASHIRO, Masato *et al.* Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 584-587, 2012.
- VERMEULEN, E.; LAGROU, K.; VERWEIJ, P. E. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 493–500, dez. 2013.
- WOLFE, A. D. ISSR Techniques for Evolutionary Biology. **Methods in Enzymology**, v. 395, p. 134–144, 2005.
- ZHANG, C. S.; XING, F. G.; SELVARAJ, J. N.; YANG, Q. L.; ZHOU, L.; ZHAO, Y. J.; *et al.* The effectiveness of ISSR profiling for studying genetic diversity of *Aspergillus flavus* from peanut-cropped soils in China. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 147–153, 4 maio 2013.

