

DIVERSIDADE GENÉTICA E PERFIL DE *MATING TYPE* EM ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Aspergillus fumigatus* DA AMÉRICA LATINA

Palavras-Chave: *Aspergillus fumigatus*, *mating type*, microssatélite

Autores:

Marcela Asfora Falabella Leme, Graduada em Medicina na PUC-Campinas
Prof. Dr. Plínio Trabasso (orientador), Depto. Clínica Médica – FCM/Unicamp

INTRODUÇÃO:

A espécie *Aspergillus fumigatus* é um fungo saprofítico, pertencente ao filo Ascomycota, o qual produz grande quantidade de esporos amplamente distribuídos na atmosfera, e, quando inalados, conseguem alcançar os alvéolos pulmonares (1,2). No contexto clínico atual, o fungo em questão representa grande ameaça a indivíduos imunocomprometidos, em virtude de sua capacidade de promover infecções invasivas conhecidas como aspergilose (3,4). Ainda, é realidade o crescente aparecimento, em diversas regiões do mundo, de espécies, particularmente *A. fumigatus*, resistentes a drogas antifúngicas (5). Tal fato, junto ao aumento de pacientes vulneráveis ao fungo, justificam as altas taxas de mortalidade por aspergilose (6). Assim como em outros continentes, pouco se sabe sobre a epidemiologia da aspergilose na América Latina, a ocorrência de resistência e a diversidade genética de *A. fumigatus*.

Neste cenário, os genes *mating type* MAT1-1 e MAT1-2, relacionados à reprodução sexuada nos fungos da espécie *A. fumigatus* (7), mostram-se relevantes, visto a presença de evidências que relacionam tais genes ao aumento da variabilidade genética e ao surgimento de cepas resistentes aos azóis (8). Ainda, uma possível relação de tais genes com suas características de virulência e patogenicidade, conferem a eles possíveis impactos no prognóstico e tratamento da aspergilose (1). Em complemento, a técnica de genotipagem por microssatélite, ou *Short Tandem Repeats* (STR), a qual consiste em repetições em tandem nas sequências de DNA (9), permite o entendimento das relações genéticas e epidemiológicas de isolados ambientais e clínicos de *A. fumigatus*, atribuindo à técnica grande relevância clínica para a compreensão de vias de transmissão e formulação de possíveis estratégias para a prevenção de patologias causadas por *A. fumigatus* (10).

Apesar dos significativos dados apresentados, o reino Fungi não é estudado com tanta frequência no contexto de doenças humanas quanto às bactérias ou infecções virais (11). Isso demonstra a relevância no desenvolvimento de novas pesquisas direcionadas a aumentar o conhecimento disponível acerca de tais microrganismos.

Esta pesquisa de iniciação científica identificou a presença de genes *mating type* MAT1-1 e MAT1-2, relacionados à reprodução sexuada em 790 amostras de DNA extraído de *A. fumigatus* isolados de amostras ambientais coletadas em 3 países da América Latina, dentre eles Brasil, Argentina e Uruguai, além da realização da técnica de genotipagem por microssatélites em 50 amostras de DNA extraído de *A. fumigatus* isolados de amostras geograficamente relacionadas à cepas resistentes a antifúngicos. O presente estudo é vinculado ao Projeto LatAsp, uma pesquisa da Rede Latino-Americana de Micologia Médica (LAMMN) com a colaboração de 26 laboratórios localizados em 12 países da América Latina, cujo objetivo é investigar o impacto do uso generalizado de antifúngicos da classe dos azóis em aplicações médicas e agrícolas, observando a resistência aos azóis de isolados de *A. fumigatus*, coletados a partir de amostras de ar de países da América Latina (12).

METODOLOGIA:

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI) da Faculdade de Ciências Médicas, da UNICAMP, Campinas, SP. Foram utilizados 790 isolados previamente identificados como *A. fumigatus* por sequenciamento da região da β -tubulina, coletados de amostras de ar de diversas regiões do Brasil, Argentina e Uruguai, provenientes de uma campanha de ciência cidadã de amostragem de ar, o Projeto LatAsp.

Para avaliar a presença de genes *mating type*, foi utilizada a metodologia descrita por Paoletti, M. et. al., no artigo “Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*” (7), que envolve a realização da técnica de PCR Multiplex. Nesse processo foram utilizados *primers* específicos do genótipo MAT1-1, AFM1 (5'-CCTTGACGCGATGGGGTGG-3'), e *primers* específicos do genótipo MAT1-2, AFM2 (5'-CCTTGACGCGATGGGGTGG-3'), juntamente com a utilização de um *primer* “comum”, o AFM3 (5'-CGGAAATCTGATGTCGCCACG-3'), permitindo amplificação simultânea com os três *primers* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA). Os fragmentos foram visualizados, então, em iluminação ultravioleta através do equipamento transluminador Amersham Imager 600 (GE Healthcare Technologies Inc.; Chicago, USA), com observação das bandas correspondentes aos genótipos MAT1-1 ou MAT1-2.

Para a genotipagem pela técnica de microssatélite foram selecionados 48 isolados de *A. fumigatus* da Argentina e do Uruguai, geograficamente próximos a cepas previamente caracterizadas como resistentes aos azóis pelo projeto LatAsp. A análise de microssatélites seguiu a metodologia descrita por Valk et al. (2005) (10).

O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os resultados obtidos da análise de microssatélites foram submetidos ao programa PhyloViz (<https://www.phyloviz.net>), que emprega o algoritmo goeBURST para a elaboração de uma *minimum spanning tree* (MST), visando representar e interpretar as potenciais relações evolutivas entre os isolados. Este projeto está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGEN) sob Nº A7F8F65, de 03/10/2021.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foi realizada a identificação de genes *mating type* MAT1-1 e MAT1-2 em um total de 790 isolados de *A. fumigatus*, sendo 564 amostras provenientes do Brasil, 115 da Argentina e 111 do Uruguai. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos genes de *mating type* (MAT1-1 e MAT1-2) em isolados ambientais de *A. fumigatus* do Brasil, Argentina e Uruguai.

País	Nº amostras	MAT1-1	MAT1-2	Dupla banda	Sem banda
Brasil	564	290	256	15	3
Argentina	115	51	63	1	0
Uruguai	111	43	63	3	2
Total	790	384	382	19	5

Com relação a genotipagem por microssatélites, foram analisados os resultados de 48 isolados de *A. fumigatus* provenientes do Uruguai e da Argentina, e foram comparados com o microssatélite de 2 amostras provenientes do Uruguai, previamente caracterizadas como resistentes aos azóis pelo projeto LatAsp.

Tabela 2. Genótipos STR de 48 isolados de *A. fumigatus* da Argentina e Uruguai, baseados em nove loci microssatélites utilizados na análise de diversidade e construção da árvore MST.

Isolado	País	Número de repeats								
		2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
AF1	Argentina	20	25	11	38	28	7	14	9	10
AF2	Argentina	18	12	14	32	12	39	10	8	10
AF3	Argentina	18	12	21	28	11	16	8	8	7
AF4	Argentina	22	15	15	35	13	22	14	8	10
AF5	Uruguai	20	16	15	24	27	13	8	10	15
AF6	Uruguai	20	16	8	23	27	17	10	11	16
AF7	Uruguai	23	31	12	34	12	42	12	9	7
AF8	Uruguai	17	22	13	38	39	24	10	10	8
AF9	Uruguai	18	12	8	28	10	20	9	9	5
AF10	Uruguai	25	23	23	29	14	23	17	9	8
AF11	Uruguai	18	12	23	27	12	25	10	8	8
AF12	Argentina	18	24	20	15	11	14	7	8	5
AF13	Argentina	12	20	10	31	9	13	8	11	18
AF14	Argentina	18	12	11	35	37	15	8	11	14
AF15	Argentina	25	10	13	28	9	7	9	9	10
AF16	Argentina	18	12	19	26	11	18	8	9	5
AF17	Argentina	18	12	19	28	12	15	10	8	10
AF18	Argentina	20	16	12	32	26	23	10	9	5
AF19	Argentina	18	16	17	28	43	12	8	8	10
AF20	Argentina	10	16	10	26	9	20	7	5	6
AF21	Argentina	21	21	20	72	20	27	12	8	8
AF22	Uruguai	25	23	24	29	14	22	17	9	8
AF23	Argentina	23	22	23	37	14	15	10	11	10
AF24	Argentina	20	20	10	36	13	28	10	10	8
AF25	Argentina	18	12	23	32	16	14	10	8	7
AF26	Argentina	14	22	10	38	10	10	8	9	19
AF27	Uruguai	22	23	8	41	16	18	16	13	8
AF28	Uruguai	15	21	10	35	9	9	8	10	32
AF29	Uruguai	18	18	10	15	14	19	8	9	7
AF30	Argentina	18	12	18	33	16	15	10	8	10
AF31	Uruguai	20	25	17	44	23	23	10	11	10
AF32	Uruguai	23	12	23	23	13	37	10	9	8
AF33	Uruguai	19	12	14	43	12	19	10	11	10
AF34	Uruguai	17	22	13	38	39	24	10	10	8
AF35	Uruguai	24	18	15	30	22	7	10	14	8
AF36	Uruguai	20	18	13	32	11	9	10	9	10
AF37	Uruguai	18	18	18	31	12	29	10	9	5
AF38	Uruguai	21	18	8	33	10	15	12	10	6
AF39	Argentina	14	20	11	33	9	10	9	10	10
AF40	Argentina	22	19	8	28	16	19	16	13	8
AF41	Argentina	22	22	11	31	15	22	10	13	10
AF42	Argentina	26	16	15	59	13	21	14	8	10
AF43	Argentina	19	12	21	29	12	19	10	11	8
AF44	Uruguai	20	30	12	34	13	34	10	9	8
AF45	Argentina	19	16	13	29	26	21	6	9	5
AF46	Argentina	20	22	10	40	21	31	10	10	5
AF47	Argentina	21	18	23	8	13	16	12	15	10
AF48	Argentina	19	16	12	29	26	13	11	9	5

Os resultados obtidos da análise de microssatélites foram submetidos ao programa Phyloviz, o qual elaborou uma *minimum spanning tree* (MST) (Figura 1), representando as potenciais relações evolutivas entre os isolados suscetíveis do Uruguai e da Argentina, com os 2 isolados previamente caracterizados como resistentes aos azóis.

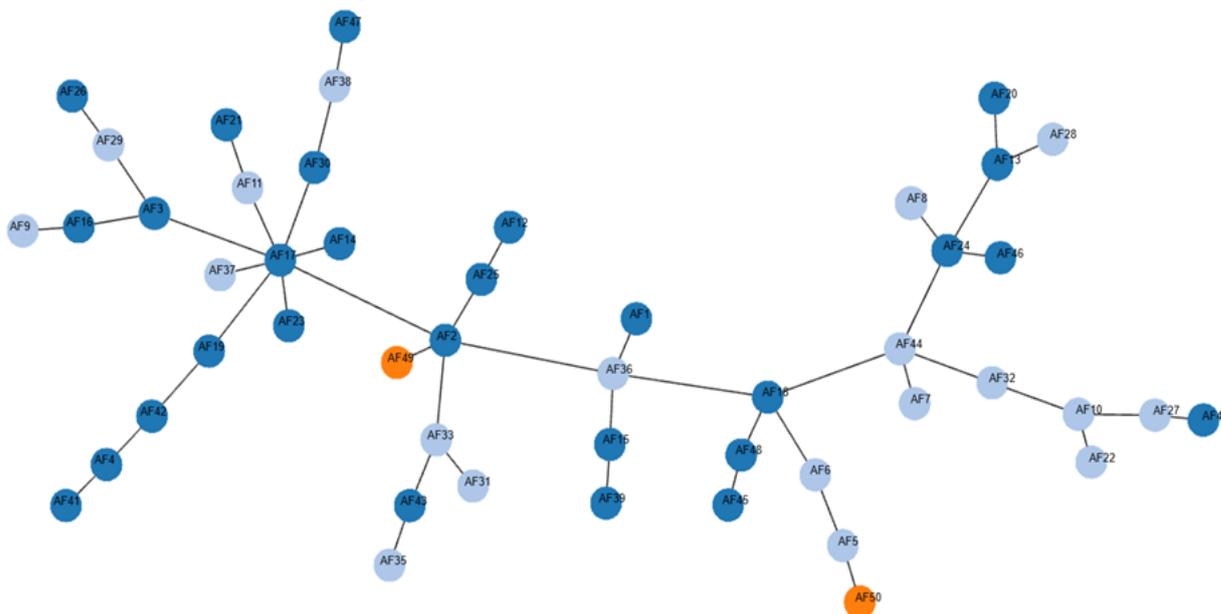


Figura 1. *Minimum spanning tree* (MST) de dados de Short Tandem Repeat (STR) utilizando o algoritmo goeBURST, mostrando as possíveis relações evolutivas entre isolados de *A. fumigatus* suscetíveis do Uruguai (azul claro) e da Argentina (azul escuro) com os isolados resistentes (laranja) do Uruguai.

A distribuição dos genes de *mating type* entre os 790 isolados ambientais de *A. fumigatus* revelou proporções relativamente equilibradas entre MAT1-1 e MAT1-2 nos três países analisados. Tal padrão é consistente com populações sexualmente competentes, o que pode favorecer o aumento da diversidade genética e potencialmente a emergência de resistência. A presença de bandas duplas ou ausência de amplificação em algumas amostras pode refletir desde limitações técnicas até possíveis heterocariontes, e requer investigação futura.

A análise de STR revelou perfis genéticos diversos entre os isolados ambientais de *A. fumigatus* da Argentina e do Uruguai. A maior parte dos isolados uruguaios apresentou genótipos únicos, o que indica uma maior variabilidade entre indivíduos dessa população. Essa variação foi refletida na *Minimum spanning tree* (MST), utilizada para representar graficamente as relações evolutivas entre os genótipos. Na MST, cada círculo representa um genótipo distinto, e as linhas que os conectam indicam semelhança genética, com base em diferenças em um ou mais loci. Observou-se que os genótipos uruguaios se distribuem de forma mais dispersa na árvore, enquanto os argentinos tendem a se agrupar mais proximamente, sugerindo estruturas populacionais diferentes entre os países.

Além disso, a MST evidenciou que os dois isolados resistentes do Uruguai pertencem a linhagens distintas, indicando possíveis eventos independentes de aquisição de resistência aos azóis. Nenhum isolado resistente foi previamente identificado entre os analisados da Argentina, embora a literatura já tenha descrito casos de resistência no país, com mecanismos moleculares bem caracterizados, como TR34/L98H e TR46/Y121F/T289A (13).

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos indicam que a população ambiental de *A. fumigatus* no presente estudo apresenta ampla diversidade genética e distribuição equilibrada dos genes *mating type*, favorecendo o potencial reprodutivo sexual da espécie. A genotipagem por microsatélites demonstrou que os isolados previamente caracterizados como resistentes do Uruguai não compartilham uma linhagem comum, o que sugere origens independentes da resistência. Esses achados reforçam a relevância de estratégias de vigilância e epidemiologia molecular, não apenas para compreender a diversidade genética de *A. fumigatus*, mas também para monitorar o surgimento e a disseminação de fenótipos resistentes em diferentes regiões da América Latina.

BIBLIOGRAFIA

1. Monteiro MC, Garcia-Rubio R, Alcazar-Fuoli L, Peláez T, Mellado E. Could the determination of *Aspergillus fumigatus* mating type have prognostic value in invasive aspergillosis? *Mycoses*. março de 2018;61(3):172–8
2. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. abril de 1999;12(2):310–50.
3. O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 22 de janeiro de 2009;457(7228):471–4.
4. Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis*. 12 de janeiro de 2024;S1473-3099(23)00692-8.
5. Barber AE, Riedel J, Sae-Ong T, Kang K, Brabetz W, Panagiotou G, et al. Effects of Agricultural Fungicide Use on *Aspergillus fumigatus* Abundance, Antifungal Susceptibility, and Population Structure. *mBio*. 24 de novembro de 2020;11(6):e02213-20.
6. Pham CD, Lockhart SR. An Invisible Threat: Mutation-Mediated Resistance to Triazole Drugs in *Aspergillus*. *Curr Fungal Infect Rep*. 1º de dezembro de 2012;6(4):288–95
7. Paoletti M, Rydholm C, Schwier EU, Anderson MJ, Szakacs G, Lutzoni F, et al. Evidence for Sexuality in the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol*. 12 de julho de 2005;15(13):1242–8.
8. Álvarez-Pérez S, Blanco JL, Alba P, García ME. Sexualidad y patogenicidad en *Aspergillus fumigatus*: ¿existe alguna relación? *Rev Iberoam Micol*. 1º de janeiro de 2010;27(1):1–5
9. Genovese LM, Geraci F, Corrado L, Mangano E, D’Aurizio R, Bordoni R, et al. A Census of Tandemly Repeated Polymorphic Loci in Genic Regions Through the Comparative Integration of Human Genome Assemblies. *Front Genet*. 2018;9:155.
10. de Valk HA, Meis JFGM, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CHW. Use of a Novel Panel of Nine Short Tandem Repeats for Exact and High-Resolution Fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* Isolates. *J Clin Microbiol*. agosto de 2005;43(8):4112–20.
11. Rokas A. Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. *Nat Microbiol*. maio de 2022;7(5):607–19.
12. Latasp [Internet]. [citado 7 de maio de 2024]. Home | LatAsp Project. Disponível em: <https://lataspergillus.wixsite.com/latasp/pt>
13. Macedo D, Leonardelli F, Gamarra S, Garcia-Effron G. Emergence of triazole resistance in *Aspergillus* spp. in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*. 2021;15:93–103. <https://doi.org/10.1007/s12281-021-00418-6>