

UNIVERSIDADE DE VILA VELHA – ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ALTERAÇÃO NO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE
Aspergillus flavus A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS APÓS
EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS**

LEANDRA MARTINS MEIRELES

VILA VELHA

MARÇO/2018

UNIVERSIDADE DE VILA VELHA – ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ALTERAÇÃO NO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE
Aspergillus flavus A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS APÓS
EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

LEANDRA MARTINS MEIRELES

VILA VELHA

MARÇO/2018

UNIVERSIDADE DE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALTERAÇÃO NO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE
***Aspergillus flavus* A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS APÓS**
EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS

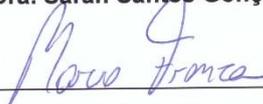
Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha como
pré-requisito do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção
grau de Mestra em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovada em 02 de março de 2018,

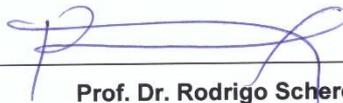
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Sarah Santos Gonçalves – UFES



Prof. Dr. Márcio Fronza - UVV



Prof. Dr. Rodrigo Scherer - UVV

Orientador

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M499a Meireles, Leandra Martins.

Alteração no perfil de susceptibilidade de *Aspergillus flavus* a antifúngicos clínicos após exposição a agrotóxicos / Leandra Martins Meireles. – 2018.

33 f.: il.

Orientador: Rodrigo Scherer.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Vila Velha, 2018.

Inclui bibliografias.

ARADECIMENTOS

- ✓ Agradeço a **Deus** por conceder saúde, força e capacidade para concluir mais uma etapa de estudos.
- ✓ A FAPES pelo financiamento e bolsa de estudos, sem ela não seria possível a conclusão deste trabalho.
- ✓ Ao meu orientador, prof. Dr Rodrigo Scherer pelo imenso apoio, por acreditar e confiar em mim durante todo período de estudo. A confiança transmitida pelo prof. a mim durante esses dois anos me motivou a aprender, dedicar e ultrapassar meus limites rumo a conclusão desse grande projeto e de iniciar uma carreira como pesquisadora.
- ✓ A prof. Dr Mariceli Lamas de Araujo que caminhou comigo durante todo o projeto sendo mais que uma coorientadora, sendo uma amiga, sempre incentivando e apoiando.
- ✓ Aos demais professores que transmitiram sem limites todo conhecimento adquirido durante anos de pesquisa em nossas aulas e até mesmo nos momentos de confraternização.
- ✓ Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional. Meus maiores incentivadores. A meu irmão, meu orgulho.
- ✓ A todos alunos-pesquisadores do lab 30, que durante esses dois anos se tornaram parte da minha família. Amigos queridos que participaram de momentos tristes e felizes. O incentivo e parceria que encontrei nesse laboratório me ensinaram lições para vida.
- ✓ Ao Phablo pelo incentivo, apoio e força transmitido que sempre me revigorava nos momentos de medo e preocupação. Você faz parte dessa história, da conclusão de uma etapa muito importante da minha vida. Você faz parte da minha história. A você não tenho palavras para agradecer.
- ✓ Aos meus amigos farmaufes: Laryssa, Glauciene, Martielo, Lílian, Gregório e Letícia. Obrigada pelo apoio, incentivo e amizade de sempre.
- ✓ Aos funcionários da UVV e integrantes do laboratório de microbiologia por sempre estarem dispostos a colaborar.
- ✓ A todos que caminharam comigo nessa jornada de dois anos de muito estudo e dedicação, muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 MICRORGANISMOS.....	14
2.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO.....	14
2.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A AGROTÓXICOS.....	15
2.4 ENSAIO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA <i>in vitro</i> (EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS)	15
2.5 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLOGICA.....	16
3. RESULTADOS	17
3.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>Aspergillus flavus</i> COM AGROTÓXICO TIABENDAZOL.....	17
3.2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>Aspergillus flavus</i> COM AGROTÓXICO TEBUCONAZOL.....	20
3.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>Aspergillus flavus</i> COM AGROTÓXICO METCONAZOL.....	22
3.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>Aspergillus flavus</i> COM POOL DE AGROTÓXICOS (TIABENDAZOL + TEBUCONAZOL + METCONAZOL).....	24
3.5 ALTERAÇÃO MACROMORFOLÓGICA.....	26
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	30
5. REFERÊNCIAS	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alteração no perfil de susceptibilidade de <i>Aspergillus flavus</i> após exposição ao agrotóxico tiabendazol (TIA). Concentração inibitória mínima (CIM) para (A) itraconazol (ITZ); (B) voriconazol (VCZ) e (C) posaconazol (POS) em três condições: <i>naïve</i> (antes da exposição), após exposição a concentrações crescentes de tiabendazol (TIA) e após período de 28 dias sem exposição ao agrotóxico (washout).....	19
Figura 2. Alteração no perfil de susceptibilidade de <i>Aspergillus flavus</i> após exposição ao agrotóxico tebuconazol (TEB). Concentração inibitória mínima (CIM) para (A) itraconazol (ITZ); (B) voriconazol (VCZ) e (C) posaconazol (POS) em três condições: <i>naïve</i> (antes da exposição), após exposição a concentrações crescentes de tebuconazol (TEB) e após período de 28 dias sem exposição ao agrotóxico (washout).....	21
Figura 3. Alteração no perfil de susceptibilidade de <i>Aspergillus flavus</i> após exposição ao agrotóxico metconazol (MET). Concentração inibitória mínima (CIM) para (A) itraconazol (ITZ); (B) voriconazol (VCZ) e (C) posaconazol (POS) em três condições: <i>naïve</i> (antes da exposição), após exposição a concentrações crescentes de metconazol (MET) e após período de 28 dias sem exposição ao agrotóxico (washout).....	23
Figura 4. Alteração no perfil de susceptibilidade de <i>Aspergillus flavus</i> após exposição ao pool de agrotóxicos. Concentração inibitória mínima (CIM) para (A) itraconazol (ITZ); (B) voriconazol (VCZ) e (C) posaconazol (POS) em três condições: <i>naïve</i> (antes da exposição), após exposição a concentrações crescentes ao pool de agrotóxicos e após período de 28 dias sem exposição ao agrotóxico (washout).....	25
Figura 5. Placas de ágar batata cultivadas com <i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 204304) mostrando alterações macromorfológicas na colônia após exposição ao pool de agroquímico. A. Colônia de <i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 204304) controle. B. Colônia de <i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 204304) após 28 dias de exposição.....	26
Figura 6. Estrutura dos compostos azólicos estudados.....	35

LISTA DE TABELA

Tabela1. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos clínicos e agrotóxicos antes do período de indução de resistência *in vitro*. 17

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC -	American Type Culture Collection
CCDCA -	Coleção de Cultura Departamento Ciências em Alimentos
CIM -	Concentração inibitória mínima
CLSI -	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DO -	Densidade optica
FIOCRUZ-	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ITZ	Itraconazol
MET	Metconazol
MOPs	3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid
POS	Posaconazol
RPM	Rotações por minuto
TIA	Tiabendazol
TEB	Tebuconazol
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VCE	Valor de corte epidemiológico
VCZ	Voriconazol
YPD	Yeast Extract, Peptone, Dextrose

RESUMO

LEANDRA MARTINS MEIRELES, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, março de 2018. **Alteração no perfil de susceptibilidade de *Aspergillus flavus* a antifúngicos clínicos após exposição a agrotóxicos.** Orientador: Dr. Rodrigo Scherer.

A resistência aos antifúngicos azólicos em *Aspergillus* foi relatada em vários países. O desenvolvimento de resistência compromete a terapia e aumenta a probabilidade de falha terapêutica. A hipótese de origem ambiental de resistência tem sido proposta e associada ao uso de agrotóxicos azólicos no meio ambiente, uma vez que os agrotóxicos azólicos são quimicamente similares aos antifúngicos azólicos usados na clínica. Neste contexto, fungos ambientais considerados patógenos humanos, como o *Aspergillus flavus*, podem desenvolver resistência cruzada. O objetivo deste estudo foi avaliar a mudança no perfil clínico de susceptibilidade antifúngica de cepas de *Aspergillus flavus* após exposição a agrotóxicos. O teste de suscetibilidade foi realizado de acordo com o protocolo CLSI M38-A2 e os microrganismos foram expostos aos agrotóxicos por 28 dias. Os antifúngicos itraconazol, voriconazol e posaconazol foram testados em concentrações que variaram de 0,313 a 16 µg/mL. Os agrotóxicos tiabendazol, tebuconazol e metconazol foram utilizados durante o período de exposição ao fungo. Além disso, foi realizada uma avaliação das características macromorfológicas das colônias. A exposição a agrotóxicos alterou o perfil de suscetibilidade para os antifúngicos itraconazol, voriconazol e posaconazol; essa alteração foi caracterizada por um aumento na CIM de até 16, 16 e 32 vezes, respectivamente, evidenciando o desenvolvimento de fenótipos de resistência. As mudanças mais significativas foram encontradas após a exposição a um pool de agrotóxicos; essas alterações são relatadas aqui pela primeira vez. Para a combinação de metconazol, tebuconazol e tiabendazol, foi observado aumento do valor de CIM de 256 vezes. Este resultado indica uma ação sinérgica entre os compostos azólicos que potencia o desenvolvimento de resistência cruzada. Além disso, a exposição a agrotóxicos mudou a pigmentação das colônias de verde para branco. O desenvolvimento de resistência cruzada gera grande preocupação na comunidade médica, porque a resistência cruzada está associada a riscos para a saúde humana, os agrotóxicos azólicos são usados indiscriminadamente e uma única aplicação geralmente inclui mais de um composto azólico.

Palavras-chave: Aspergilose; Drogas azólicas; Resistência; Infecções fúngicas; Antifúngicos; CIM

ABSTRACT

LEANDRA MARTINS MEIRELES, M.Sc, Vila Velha University - ES, March 2018. **Change in the susceptibility profile of *Aspergillus flavus* to clinical antifungal after exposure to pesticides.** Advisor: Dr. Rodrigo Scherer.

Resistance to azole antifungals in *Aspergillus* has been reported in several countries. The development of resistance compromises therapy and increases the likelihood of therapeutic failure. The hypothesis of an environmental origin of resistance has been proposed and associated with the use of azole pesticides in the environment since azole pesticides are chemically similar to the azole antifungals used in the clinic. In this context, environmental fungi considered human pathogens, such as *Aspergillus flavus*, may develop cross-resistance. The aim of this study was to evaluate the change in the clinical antifungal susceptibility profile of *Aspergillus flavus* strains after exposure to pesticides. The susceptibility testing was performed according to the CLSI M38-A2 protocol, and the microorganisms were exposed to the pesticides for 28 days. The antifungals itraconazole, voriconazole and posaconazole were tested at concentrations ranging from 0.313 to 16 µg/mL. The pesticides thiabendazole, tebuconazole and metconazole were used during the fungal exposure period. In addition, an evaluation of the macromorphological characteristics of the colonies was carried out. Exposure to pesticides altered the susceptibility profile for the antifungal agents itraconazole, voriconazole and posaconazole; this change was characterized by an increase in the MIC of up to 16, 16 and 32 times, respectively, evidencing the development of resistance phenotypes. The most significant changes were found after exposure to a pool of the pesticides; these changes are reported here for the first time. For the combination of metconazole, tebuconazole and thiabendazole, an increase in the MIC of 256 times was observed. This result indicates a synergistic action among azole compounds that potentiates the development of cross-resistance. In addition, exposure to pesticides changed the pigmentation of the colonies from green to white. The development of cross-resistance generates great concern in the medical community because cross-resistance is associated with risks to human health, azole pesticides are used indiscriminately, and a single application often includes more than one azole compound.

Keywords: Aspergillosis; Azole drugs; Resistance; Fungal infections; Antifungals; MIC

1. INTRODUÇÃO

Aspergillus flavus apresenta ampla distribuição ambiental, favorecida pela formação de conídios altamente tolerantes a condições adversas [1,2] e também é considerado um importante patógeno, sendo responsável por diversas doenças em humanos [3]. A rota primária de infecção é caracterizada pela inalação de conídios que, devido ao seu tamanho reduzido, chegam facilmente aos alvéolos pulmonares causando infecções locais e invasivas [2,4]. O tipo de infecção depende da condição imune do indivíduo, em pacientes imunocomprometidos, a aspergilose invasiva é associada a elevada morbidade e mortalidade [5], sendo *Aspergillus flavus* a espécie não-*fumigatus* mais comum e responsável por infecções refratárias e graves que envolvem diversos órgãos [3].

A terapia para aspergilose compreende o uso de antifúngicos azólicos de última geração, como voriconazol e posaconazol [6,7]. O uso demasiado de antifúngicos azólicos na profilaxia e combate as infecções tem direcionado o aparecimento de resistência [1,8]. No entanto, a recuperação de cepas resistentes em pacientes azol-naïve e o isolamento de cepas resistentes no ambiente indicam uma nova rota de desenvolvimento de resistência, possivelmente de origem ambiental [8,9]. Essa nova rota de resistência tem sido associada a extensa utilização de agrotóxicos azólicos na agricultura, destinados a tratar e prevenir prejuízos causados por fitopatógenos [8]. Nesse contexto, espécies de *Aspergillus*, onipresente na natureza, sofrem forte pressão seletiva, reduzindo a população de cepas sensíveis e selecionando genótipos resistentes [2,10].

Os compostos azólicos inibem a biossíntese de ergosterol através da ligação com a enzima lanosterol 14 α -desmetilase interrompendo a produção do esterol,

como consequência, a membrana celular perde estabilidade, prejudicando o crescimento e a replicação do fungo. A resistência aos azólicos pode ocorrer essencialmente por quatro mecanismos: afinidade reduzida a enzima alvo decorrente de mutações pontuais no gene *cyp51A*; Super expressão de enzima em consequência da regulação positiva do gene *cyp51A*; Aumento do efluxo de composto azólico da célula em razão da maior expressão de transportadores de membrana; Além de mutações secundárias que conferem resistência. Contudo, os mecanismos de resistência são complexos e não totalmente elucidados [7].

A ocorrência de cepas azol-resistente tem sido reportada em diversas partes do mundo de forma crescente [3,11–16]. Para a identificação de cepas resistentes, valores de corte epidemiológicos (VCEs) são estabelecidos com base em ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e auxiliam a identificar cepas com susceptibilidade reduzida [17]. É importante destacar que a ocorrência de resistência limita gravemente as opções de tratamento e gera grande preocupação a comunidade médico-científica, além de trazer consequências devastadoras a população mundial [18].

Considerando a relevância das infecções causadas por *Aspergillus flavus* e a importância dos compostos azólicos no tratamento, além do uso indiscriminado de agrotóxicos azólicos na agricultura, sendo muitas vezes utilizado mais de um agrotóxico na mesma cultura, e da possibilidade de desenvolvimento de resistência cruzada entre antifúngicos clínicos e agrotóxicos azólicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a exposição de cepas azol-naïve de *Aspergillus flavus* à agrotóxicos azólicos altera o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos clínicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Duas cepas de *Aspergillus flavus*, obtidas de amostras de café, CCDCA 1043 (coordenadas *lat*: -21.245278 *long*: -44.999722 WGS84) e CCDCA 1049 (coordenadas *lat*: -21.245278 *long*: -44.999722 WGS84), foram doadas pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) e uma cepa de *Aspergillus flavus* ATCC 204304 (INCQS 40182) cedida pela FIOCRUZ-INCQS.

2.2 Testes de suscetibilidade a antifúngicos de uso clínico

O teste de susceptibilidade foi realizado de acordo com o método de referência do Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (CLSI) M38-A2 [19] para os antifúngicos itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ) e posaconazol (POS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). As soluções de antifúngicos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e, posteriormente, diluídas em RPMI-1640 com MOPs (Ácido 3- [N-morfolino] propanossulfônico de concentração 0,165 mol/L e pH 7,0). A concentração final dos antifúngicos variou entre 0,03 a 16 µg/mL em microplaca de 96 poços. O preparo do inóculo foi realizado por meio de método espectrofotométrico a 530 nm a densidade ótica (DO) de 0,09 a 0,13 para obter concentração final entre $0,4 \times 10^4$ UFC/mL a 5×10^4 UFC/mL.

As soluções de antifúngicos e inóculo foram adicionadas em microplacas de 96 poços seguindo a seguinte ordem: no poço controle foi adicionado 100 µL de RPMI-1046 + 100 µL de inóculo. Nos poços testes, foram adicionados 100 µL do antifúngico em diferentes concentrações diluído em RPMI-1640 + 100 µL de inóculo. No poço controle do solvente foi adicionado 100 µL de RPMI-1640 com DMSO + 100 µL do inóculo. O valor da concentração inibitória mínima (CIM) foi determinado após

48 h de incubação a 35°C por meio de leitura visual com auxílio de um espelho invertido. A menor concentração que resultou em inibição completa do crescimento do microrganismo comparado com o controle positivo (microrganismo sem a droga) foi considerada o valor de CIM. Os resultados foram validados com a cepa controle (*Aspergillus flavus* ATCC 204304). O experimento foi realizado em duplicata

2.3 Testes de suscetibilidade a agrotóxicos

O teste de susceptibilidade aos agrotóxicos tiabendazol (TIA), tebuconazol (TEB) e metconazol (MET) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi realizado de acordo com o item 2.2, uma vez que não há protocolo padronizado para testes de susceptibilidade utilizando esses compostos contra os microrganismos estudados.

2.4 Ensaio de indução de resistência *in vitro* (exposição aos agrotóxicos)

O ensaio foi adaptado do estudo de Faria-Ramos et al [20] para os agrotóxicos TIA, TEB e MET. Um mililitro do inóculo foi adicionado a erlenmeyers contendo 99 mL de caldo YPD. Ao meio de cultura foi adicionado concentrações sub-inibitórias dos agrotóxicos, separadamente. Adicionalmente realizou-se a exposição do microrganismo ao pool de agrotóxico (associação dos 3 agrotóxicos). A exposição das cepas aos agrotóxicos ocorreu durante 28 dias. Sendo a concentração dos agrotóxicos de 25% do valor de CIM no dia zero até 14 dias, de 14 a 21 dias a concentração foi aumentada para 35%, e de 21 a 28 dias, foi de 45% do valor de CIM. Os erlenmeyers foram incubados em shaker orbital a 35°C com agitação (180 rpm).

Após o período de indução de resistência, o microrganismo foi cultivado em caldo YPD por 28 dias na ausência de agrotóxicos (washout) sob as mesmas condições de temperatura e agitação. Durante o período de exposição aos

agrotóxicos e no período washout as cepas foram repicadas a cada 72h de incubação para garantir a viabilidade do microrganismo.

A determinação do valor de CIM para antifúngicos foi realizado nos dias 7, 14, 21, 28 de exposição, para avaliar a alteração no perfil de susceptibilidade. Após o período washout o teste de susceptibilidade foi novamente realizado para avaliar a estabilidade das alterações.

2.5 Análise das características macromorfológicas

A análise foi realizada após a exposição aos agrotóxicos para identificar a ocorrência de possíveis alterações. Para a análise 100 µL de inóculo preparado de acordo com o CLSI M38-A2, foi repicado em placas de ágar batata. As placas foram incubadas a 35°C por 7 dias para avaliação visual das características das colônias.

3. RESULTADOS

A **tabela 1** apresenta os valores de CIM para as drogas testadas no estudo antes do ensaio de indução de resistência *in vitro*.

Tabela1. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos clínicos e agrotóxicos antes do período de indução de resistência *in vitro*.

Cepa	CIM ($\mu\text{g/mL}$)					
	Antifúngicos			Agrotóxicos		
	ITZ	VCZ	POS	TIA	TEB	MET
ATCC 204304	0,25	0,5	0,0625	8,0	1,0	0,5
CCDCA 1049	0,0625	0,125	0,0625	4,0	2,0	1,0
CCDCA 1043	0,125	0,5	0,0625	8,0	2,0	1,0

Atualmente, poucos estudos relatam os valores de corte epidemiológicos (VCE) para *Aspergillus*, além disso, os VCEs não foram estabelecidos pelo CLSI para os novos azólicos, como VCZ e POS. Desta forma, foram utilizados como base os valores reportados por Meletiadis et al [17] para identificação de cepas resistentes de *Aspergillus flavus*, sendo 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para ITZ e VCZ, e 0,125 $\mu\text{g/mL}$ para POS.

3.1 Indução de resistência dos isolados de *Aspergillus flavus* com agrotóxico tiabendazol

Todas as cepas avaliadas apresentaram alteração no perfil de susceptibilidade para ITZ, VCZ e POS quando expostas ao agrotóxico, no entanto, a cepa ATCC apresentou alteração para ITZ e POS a partir do 14^o dia de exposição (**Fig. 1**).

O valor de CIM para a cepa ATCC aumentou 4 vezes, excedendo o VCE (CIM > 1 $\mu\text{g/mL}$) e caracterizando o desenvolvimento da resistência para VCZ (**Fig. 1B**),

além disso, essa alteração se manteve no período washout, indicando que a resistência pode ser irreversível.

Adicionalmente, todas as cepas apresentaram fenótipo de resistência para POS (CIM > 0,125 µg/mL) durante a exposição e no período whasout, com aumento no valor de CIM de até 16 vezes (**Fig. 1C**). Os resultados sugerem desenvolvimento de resistência cruzada entre TIA e POS para todos os isolados.

Apesar de não ocorrer alteração no fenótipo para as cepas testadas frente ao antifúngico ITZ, foi observado aumento no valor do CIM de até 8 vezes durante a exposição e no período washout (**Fig. 1A**).

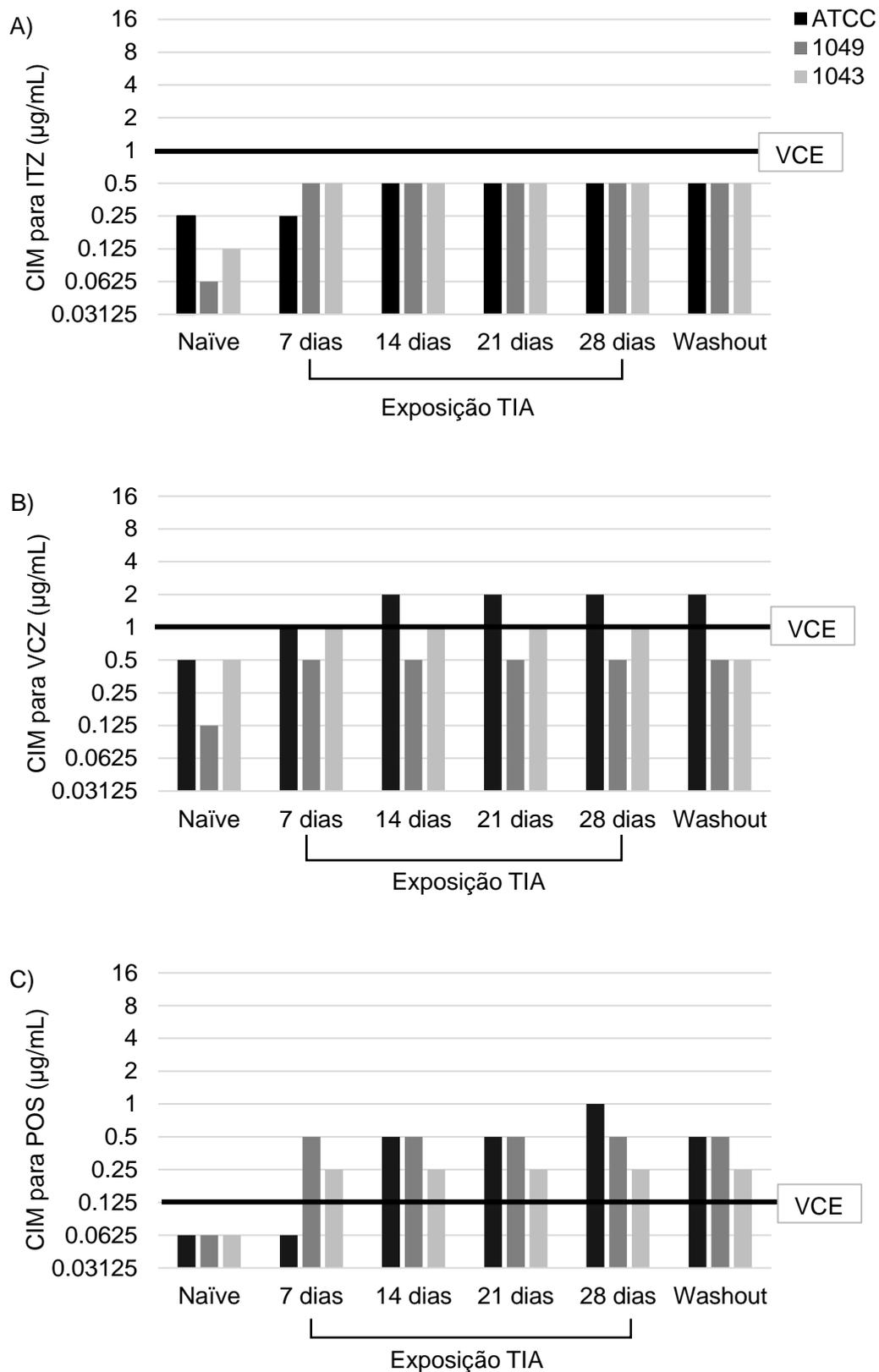


Fig. 1. Alteração no perfil de susceptibilidade de *Aspergillus flavus* após exposição ao agrotóxico tiabendazol (TIA). Concentração inibitória mínima (CIM) para (A) itraconazol (ITZ); (B) voriconazol (VCZ) e (C) posaconazol (POS) em três condições: *naïve* (antes da exposição), após exposição a concentrações crescentes de tiabendazol (TIA) e após período washout (28 dias).

3.2 Indução de resistência dos isolados de *Aspergillus flavus* com agrotóxico tebuconazol

Todos os isolados apresentaram redução da susceptibilidade frente as drogas ITZ, VCZ e POS durante o período de exposição, contudo, a cepa ATCC apresentou redução na susceptibilidade para ITZ apenas a partir do 14° dia (**Fig. 2**).

O valor de CIM para a cepa CCDCA 1043 aumentou 4 vezes e correspondeu a fenótipo de resistência (CIM > 1 µg/mL) para VCZ durante a exposição ao agrotóxico (**Fig. 2B**), porém esse fenótipo não se manteve no período washout.

Para POS, todos os isolados apresentaram evidente redução da susceptibilidade (CIM > 0,125 µg/mL) (**Fig. 2C**) com aumento do valor de CIM de até 32 vezes, caracterizando fenótipo de resistência. O fenótipo de resistência se manteve no período washout para todas as cepas, sugerindo desenvolvimento de resistência cruzada entre agrotóxico TEB e o antifúngico POS (**Fig. 2C**).

Apesar de não ocorrer alteração no fenótipo para as cepas testadas frente ao antifúngico ITZ, foi observado aumento no valor de CIM de até 8 vezes durante a exposição, as alterações foram mantidas no período washout (**Fig. 2 A**).

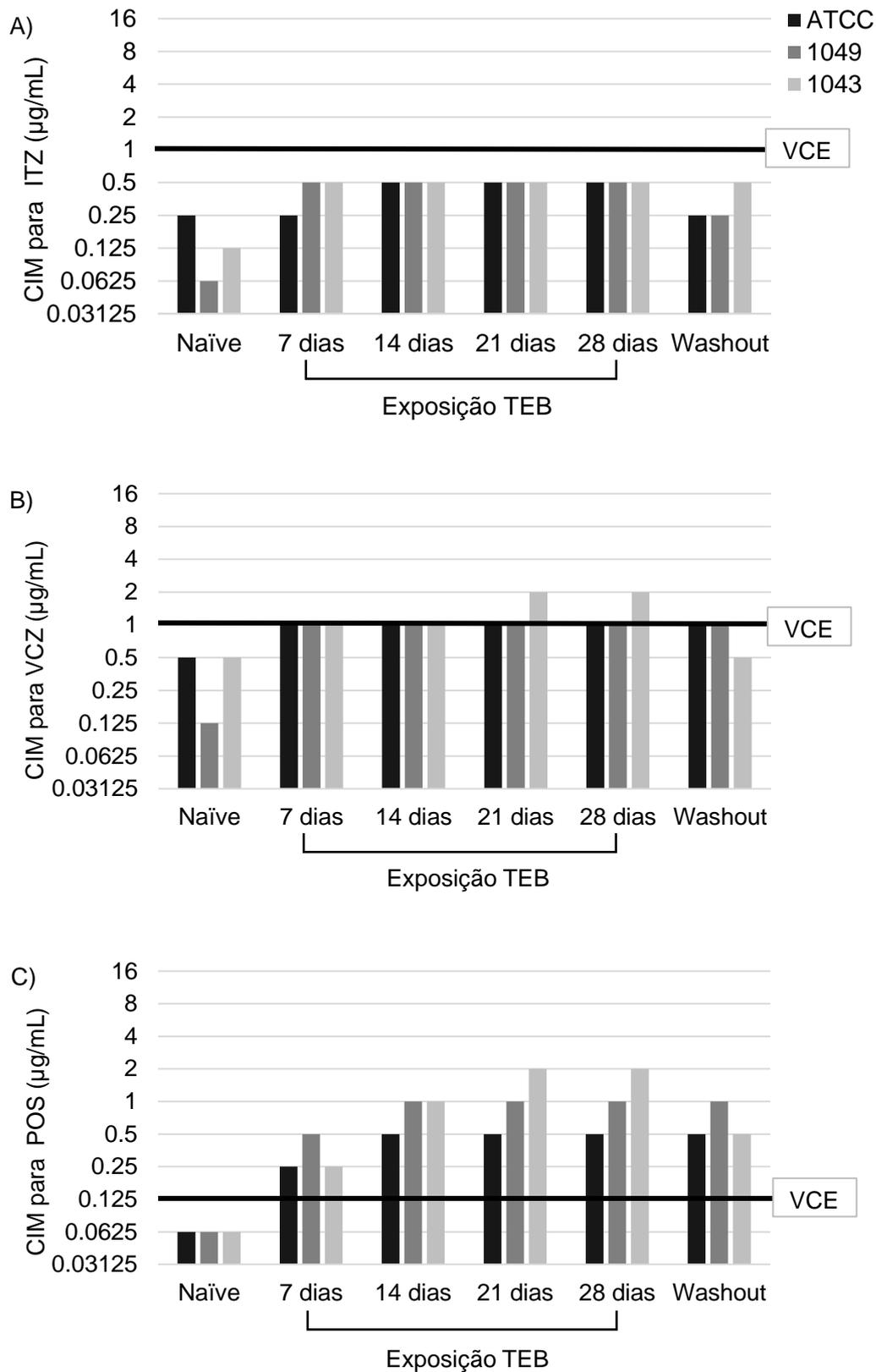


Fig. 2. Alteração no perfil de susceptibilidade de *Aspergillus flavus* após exposição ao agrotóxico tebuconazol (TEB). Concentração inibitória mínima (CIM) para (A) itraconazol (ITZ); (B) voriconazol (VCZ) e (C) posaconazol (POS) em três condições: *naïve* (antes da exposição), após exposição a concentrações crescentes de tebuconazol (TEB) e após período washout (28 dias).

3.3 Indução de resistência dos isolados de *Aspergillus flavus* com agrotóxico metconazol

Todos os isolados apresentaram redução da susceptibilidade frente as drogas ITZ, VCZ e POS, porém novamente a cepa ATCC apresentou alteração na susceptibilidade a partir do 14° dia para ITZ (**Fig. 3**).

Para as cepas ATCC e CCDCA 1043, o valor de CIM (CIM > 1 µg/mL) para VCZ aumentou até 4 vezes, que correspondeu ao fenótipo de resistência, entretanto, o fenótipo não se manteve no período washout (**Fig. 3B**).

Para POS todas as cepas apresentaram aumento nos valores de CIM (CIM > 0,125 µg/mL) de até 32 vezes, caracterizando fenótipo de resistência durante a exposição, o fenótipo se manteve no período whasout, sugerindo desenvolvimento de resistência cruzada entre MET e POS (**Fig. 3C**).

Para ITZ os isolados não apresentaram alteração no fenótipo sensível durante a exposição, entretanto, foi observado um aumento de até 16 vezes no valor de CIM (**Fig. 3A**).

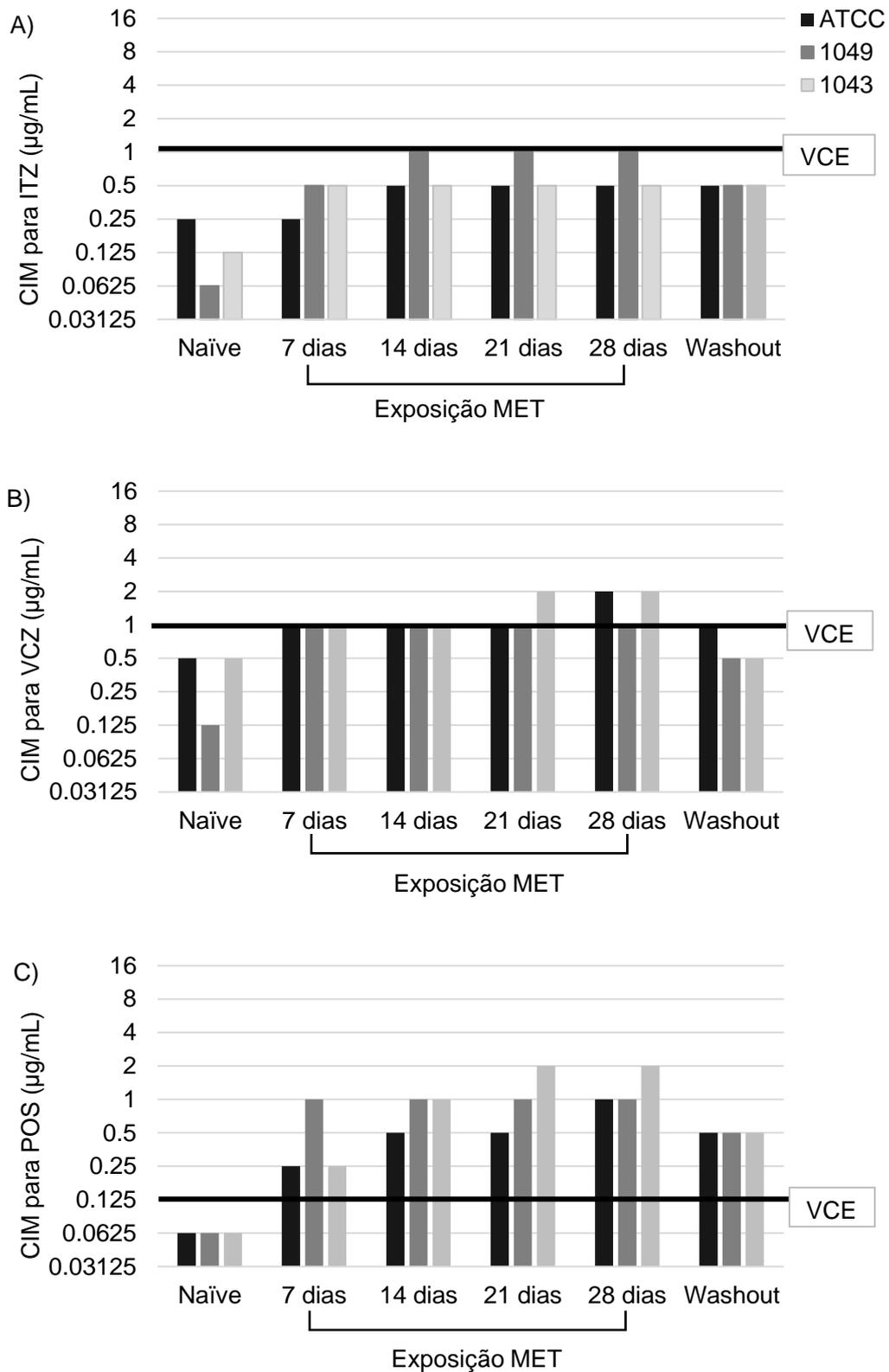


Fig. 3. Alteração no perfil de susceptibilidade de *Aspergillus flavus* após exposição ao agrotóxico metconazol (MET). Concentração inibitória mínima (CIM) para (A) itraconazol (ITZ); (B) voriconazol (VCZ) e (C) posaconazol (POS) em três condições: *naïve* (antes da exposição), após exposição a concentrações crescentes de metconazol (MET) e após período washout (28 dias).

3.4 Indução de resistência dos isolados de *Aspergillus flavus* com pool de agrotóxicos (tiabendazol + tebuconazol + metconazol)

Adicionalmente, foi realizado a exposição das cepas à associação de todos os agrotóxicos (pool de agrotóxicos) para avaliar a ocorrência de sinergismo na ação entre eles. Todas as cepas apresentaram alterações no perfil de susceptibilidade, sendo que para ATCC a alteração ocorreu a partir do 14º dia para ITZ (**Fig. 4**).

Para VCZ foram observados valores de CIM de até 32 vezes superior para ATCC foi observado durante a exposição ao pool de agrotóxico, contudo, no período washout todas as cepas apresentam valores de CIM abaixo do VCE, sendo reversível as alterações no perfil de susceptibilidade (**Fig. 4B**).

Para o antifúngicos POS, foram observados valores de CIM de até 256 vezes ao valor das cepas antes da exposição (*naïve*) (CIM = 16 µg/mL). No período washout, apesar de uma pequena redução no valor da CIM, todas as cepas mantiveram valores de CIM acima do VCE. Os resultados evidenciam claramente que, além de propiciar o desenvolvimento de resistência cruzada, o sinergismo entre as moléculas potencializou o efeito (**Fig. 4B e 4C**).

Para ITZ, novamente foram observados efeitos menos significativos (**Fig. 4A**).

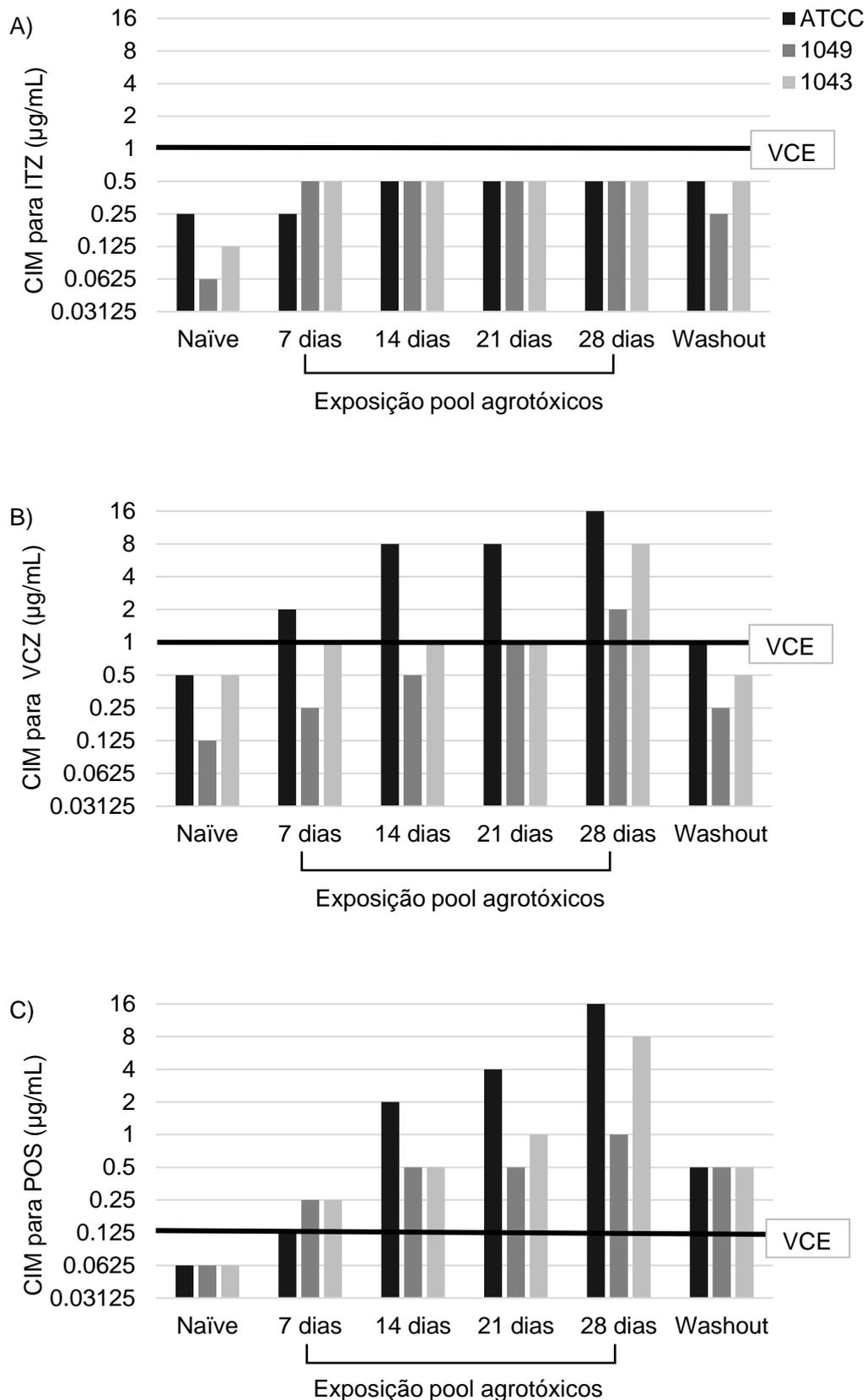


Fig. 4. Alteração no perfil de susceptibilidade de *Aspergillus flavus* após exposição ao pool de agrotóxicos. Concentração inibitória mínima (CIM) para (A) itraconazol (ITZ); (B) voriconazol (VCZ) e (C) posaconazol (POS) em três condições: *naïve* (antes da exposição), após exposição a concentrações crescentes ao pool de agrotóxicos e após período washout (28 dias).

3.5 Alteração morfológica

Após o período exposição, além da alteração no perfil de susceptibilidade foi observada alteração na coloração das colônias, mudando a pigmentação da cor verde para branco (**Fig. 5**). As colônias mantiveram-se planas e granuladas.

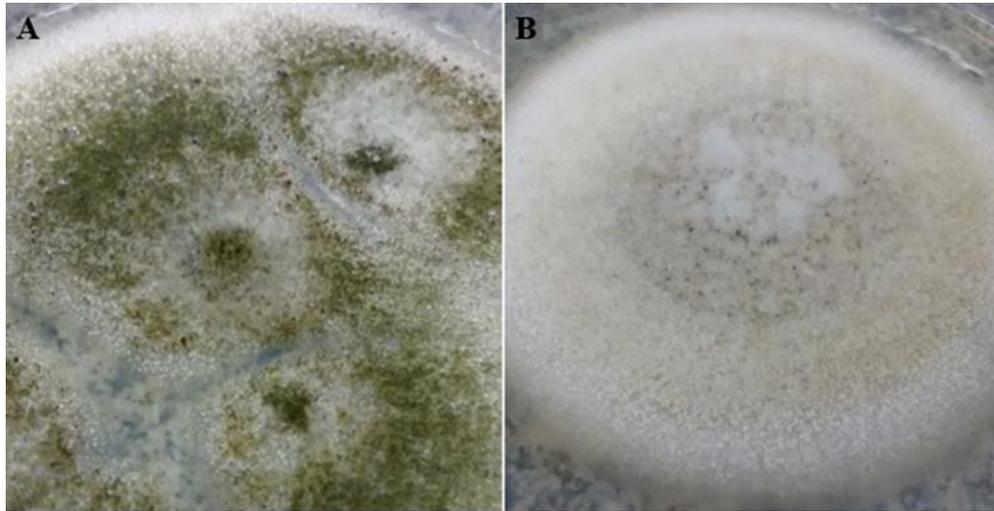


Fig. 5. Placas de ágar batata cultivadas com *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) mostrando alterações macromorfológicas na colônia após exposição ao pool de agrotóxico. A. Colônia de *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) controle. B. Colônia de *Aspergillus flavus* após 28 dias de exposição.

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de resistência com origem ambiental é fundamentado na utilização de agrotóxicos azólicos no ambiente. Sabe-se que cerca de um terço das vendas de agrotóxicos são de compostos azólicos, e que 99% deles são utilizados na agricultura [8]. Uma evidência que comprova a rota ambiental de desenvolvimento de resistência é a prevalência de um único mecanismo de resistência (TR34/L98H) em 90% dos isolados *Aspergillus* recuperados de diferentes pacientes [13,20].

Os compostos azólicos representam um exemplo importante de drogas capazes de selecionar cepas resistentes por apresentar único alvo de ação e boa estabilidade química da molécula no ambiente [8,20]. É importante considerar também a semelhança estrutural entre agrotóxicos e antifúngicos azólicos (**Fig. 6**). Estudos realizados por Chowdhary et al [8] confirmam a semelhança estrutural entre antifúngicos (ITZ, VCZ e POS) e agrotóxicos azólicos, dentre eles o TEB. Adicionalmente, o agrotóxico TEB apresenta conformação semelhante para encaixe ao sítio ativo da enzima alvo dos compostos azólicos, interagindo com os mesmos resíduos de aminoácidos que o VCZ. Snelders et al [9] também encontraram resultados equivalentes além de resistência cruzada aos antifúngicos clínicos.

Esses dados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, onde a exposição ao TEB resultou em resistência cruzada para VCZ e POS (**Fig. 2B, 2C, 4B e 4C**). Embora o agrotóxico MET apresente menor similaridade com antifúngicos clínicos [9], no presente estudo, a exposição a esse agrotóxico também resultou em alteração no perfil de susceptibilidade com conseqüente desenvolvimento de resistência (**Fig. 3**), o mesmo ocorreu para o TIA (**Fig. 1B e 1C**).

A semelhança no modo de acoplamento com a enzima alvo dos azólicos está relacionada a presença de um anel aromático halogenado próximo ao anel triazólico [9], evidência que sugere porque foram encontradas alterações nos valores de CIM que resultaram em resistência quando o microrganismo foi exposto aos agrotóxicos TEB e MET neste estudo. Uma vez que estes agrotóxicos apresentam o radical halogenado próximo ao anel azólico, como pode ser verificado na **Fig. 6**.

A distância entre o radical e o anel azólico poderia justificar as diferenças encontradas no perfil de susceptibilidade quando o microrganismo foi exposto a TEB e MET. Adicionalmente o halogênio ligado ao anel aromático poderia influenciar na afinidade de ligação com a enzima, fato que poderia explicar as alterações no valor de CIM encontradas para VCZ e POS (Fluor) serem diferentes das observadas para ITZ (Cloro).

No presente estudo também foram encontradas alterações macromorfológicas devido a exposição do microrganismo aos agrotóxicos, corroborando com estudos prévios [20,22]. Griffith et al [23] relataram o envolvimento de uma molécula homóloga aos fitocromos envolvida na iniciação e desenvolvimento do conidióforo em espécies de *Aspergillus*. Os compostos azólicos ligam-se a essa molécula e inibem esse processo. No entanto, a afinidade da ligação é variável e pode explicar a diferença de inibição apresentada pelos compostos. As alterações macromorfológicas podem ser responsáveis por identificação incorreta do microrganismo, com conseqüente erro de diagnóstico, além de comprometer a terapia [20].

A exposição de *Aspergillus flavus* aos agrotóxicos azólicos e, o posterior desenvolvimento de resistência a antifúngicos clínicos, é associado a riscos à saúde humana. O POS é um antifúngico de segunda geração (disponível desde 2006) [1] ,

e foi observado neste estudo resistência cruzada para esse antifúngico quando o microrganismo foi exposto a todos os agrotóxicos estudados. O VCZ é considerado a droga de escolha para casos de infecção por *Aspergillus* [3], contudo, para esse antifúngico, também foi observado desenvolvimento de resistência cruzada após exposição do microrganismo aos agrotóxicos, com aumento do valor de CIM de até 32 vezes. Esses resultados limitam ainda mais a terapia em casos de infecções.

A semelhança estrutural entre os compostos azólicos e o mecanismo de ação são os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de resistência. Dentre os mecanismos de resistência já estudados a literatura relata que, mutações no gene que codifica a enzima alvo é o principal mecanismo de resistência, contudo outros mecanismos podem estar envolvidos isoladamente ou em conjunto [7].

Tendo em vista que a redução da susceptibilidade *in vitro* pode estar associada a falha terapêutica, e que mais de um mecanismo de resistência pode estar envolvido, é importante destacar que estudos posteriores devem ser realizados para compreender as diferenças no perfil de susceptibilidade encontradas, além de explicar porque alguns agrotóxicos são melhores indutores de resistências que outros, como vimos no presente estudo, e se um período maior de exposição a agrotóxicos pode resultar em definitivas alterações na susceptibilidade.

5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho revelaram que a exposição de cepas de *Aspergillus flavus* aos agrotóxicos resultou em desenvolvimento de resistência cruzada para os antifúngicos VCZ e POS. Adicionalmente, a exposição ao pool de agrotóxicos (associação dos 3 agrotóxicos) teve efeitos ainda mais evidentes no desenvolvimento da resistência (aumento do valor de CIM de até 256 vezes). Esses resultados servem de alerta aos órgãos públicos e agências reguladoras para um controle mais rigoroso quanto ao uso de agrotóxicos azólicos no ambiente e para comunidade médica-científica uma vez que a terapia para infecções causadas por *Aspergillus* é limitada.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJG, Meis JF. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? Clin Infect Dis 2016;62:362–8. doi:10.1093/cid/civ885.
- [2] Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. Microb Biotechnol 2017;10:296–322. doi:10.1111/1751-7915.12367.
- [3] Natesan SK, Lamichchane AK, Swaminathan S, Wu W. Differential expression of ATP-binding cassette and/or major facilitator superfamily class efflux pumps contributes to voriconazole resistance in *Aspergillus flavus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2013;76:458–63. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.022.
- [4] Garcia-Rubio R, Cuenca-Estrella M, Mellado E. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. Drugs 2017. doi:10.1007/s40265-017-0714-4.
- [5] Caffrey AK, Obar JJ. Alarmin(g) the innate immune system to invasive fungal infections. Curr Opin Microbiol 2016;32:135–43. doi:10.1016/j.mib.2016.06.002.
- [6] Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4545–9. doi:10.1128/AAC.00692-10.
- [7] Parker JE, Warrilow AGS, Price CL, Mullins JGL, Kelly DE, Kelly SL.

- Resistance to antifungals that target CYP51. *J Chem Biol* 2014;7:143–61. doi:10.1007/s12154-014-0121-1.
- [8] Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog* 2013;9. doi:10.1371/journal.ppat.1003633.
- [9] Snelders E, Camps SMT, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Kema GHJ, van der Lee HA, et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 2012;7:e31801. doi:10.1371/journal.pone.0031801.
- [10] Bader O, Tünnermann J, Dudakova A, Tangwattanachuleeporn M, Weig M, Groß U, et al. Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:4356–9. doi:10.1128/AAC.00100-15.
- [11] Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Diekema D, et al. Use of Epidemiological Cutoff Values To Examine 9-Year Trends in Susceptibility of *Aspergillus* Species to the Triazoles. *J Clin Microbiol* 2011;49:586–90. doi:10.1128/JCM.02136-10.
- [12] van der Linden JWM, Snelders E, Kampinga GA, Rijnders BJA, Mattsson E, Debets-Ossenkopp YJ, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1846–54. doi:10.3201/eid1710.110226.
- [13] Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Sharma C, Sundar G, Singh PK, et al. Clonal Expansion and Emergence of Environmental Multiple-Triazole-Resistant

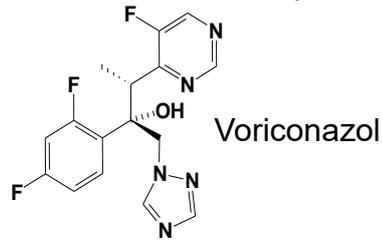
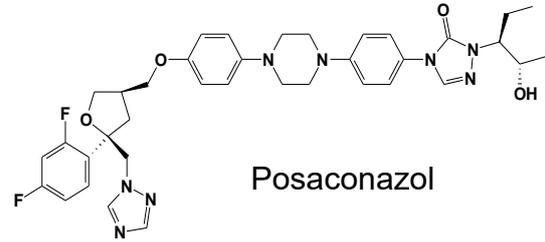
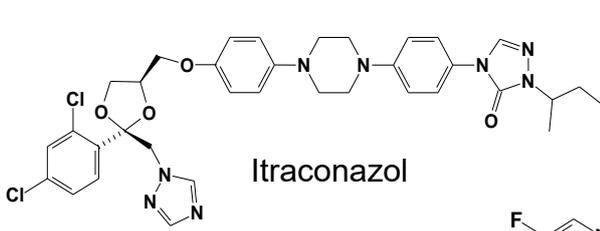
- Aspergillus fumigatus* Strains Carrying the TR34/L98H Mutations in the *cyp51A* Gene in India. *PLoS One* 2012;7:e52871. doi:10.1371/journal.pone.0052871.
- [14] Pham CD, Reiss E, Hagen F, Meis JF, Lockhart SR. Passive surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011-2013. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1498–503. doi:10.3201/eid2009.140142.
- [15] Seyedmousavi S, Brüggemann RJM, Meis JF, Melchers WJG, Verweij PE, Moutona JW. Pharmacodynamics of isavuconazole in an *Aspergillus fumigatus* mouse infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:2855–66. doi:10.1128/AAC.04907-14.
- [16] Dauchy C, Bautin N, Nseir S, Reboux G, Wintjens R, Le Rouzic O, et al. Emergence of *Aspergillus fumigatus* azole resistance in azole-naïve patients with chronic obstructive pulmonary disease and their homes. *Indoor Air* 2018;28:298–306. doi:10.1111/ina.12436.
- [17] Meletiadis J, Mavridou E, Melchers WJG, Mouton JW, Verweij PE. Epidemiological Cutoff Values for Azoles and *Aspergillus fumigatus* Based on a Novel Mathematical Approach Incorporating *cyp51A*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2524–9. doi:10.1128/AAC.05959-11.
- [18] Fairlamb AH, Gow NAR, Matthews KR, Waters AP. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Nat Microbiol* 2016;1:16092. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.92.
- [19] CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard — Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. vol. 28. 2008.
- [20] Faria-Ramos I, Farinha S, Neves-Maia J, Tavares PR, Miranda IM, Estevinho

- LM, et al. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. BMC Microbiol 2014;14:155. doi:10.1186/1471-2180-14-155.
- [21] Snelders E, van der Lee HAL, Kuijpers J, Rijs AJMM, Varga J, Samson RA, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. PLoS Med 2008;5:e219. doi:10.1371/journal.pmed.0050219.
- [22] Varanasi NL, Baskaran I, Alangaden GJ, Chandrasekar PH, Manavathu EK. Novel effect of voriconazole on conidiation of *Aspergillus species*. Int J Antimicrob Agents 2004;23:72–9. doi:10.1016/j.ijantimicag.2003.05.011.
- [23] Griffith GW, Jenk GI, Milner-White EJ CA. Homology at the amino acid level between plant phytochromes and regulator of sexual sporulation in *Emericella (=Aspergillus) nidulans*. Photochem Photobiol 1994;59:252–6. doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05030.x.

Referências formatadas de acordo com as normas da revista International Journal of Antimicrobial Agents

ANEXO

Antifúngicos Clínicos



Agrotóxicos

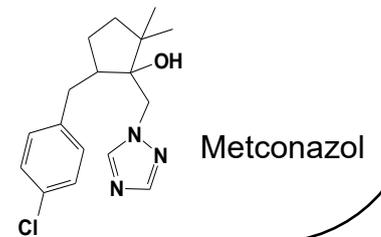
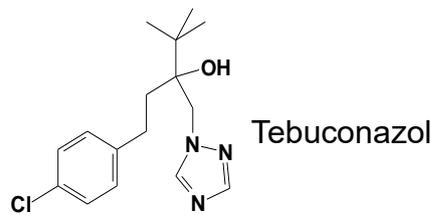
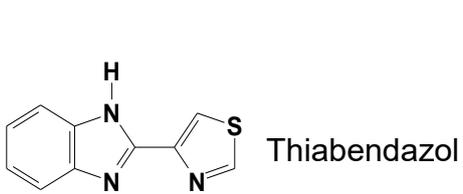


Fig. 6. Estrutura dos compostos azólicos clínicos e agrotóxicos estudados.