

Artículo original

Aspergillus fumigatus: análisis microscópico de su estructura en un modelo de biofilm in vitro

Alicia Gómez López ^{1*}, Candela Fernández Fernández ², María de los Llanos Martínez Poyato ³, Rocío Sánchez León ⁴

¹ Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología, LRIM-CNM-ISCIH, aliciagl@isciii.es; <https://orcid.org/0000-0003-2780-5039>

² Universidad de Alcalá; candela.fernandez.fdez@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3277-7522id>

³ Universidad de Alcalá; llanos.martinez@edu.uah.es; <https://orcid.org/0000-0002-7348-3950>

⁴ Universidad Complutense de Madrid; rosanle2505@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002>

* Autor correspondencia: aliciagl@isciii.es; <https://orcid.org/0000-0003-2780-5039>; Tel.: +34 918223426

DOI: <https://doi.org/10.37536/RIECS.2022.7.2.337>

Resumen: La enfermedad asociada al biofilm está siendo evaluada con profundidad en diferentes campos de la Microbiología Clínica, en tanto que representa un importante problema de salud pública. La formación de biofilms constituye un modo de crecimiento que hace que las células que lo forman sean menos susceptibles a los antimicrobianos y a la acción del sistema inmune del huésped y, permite que los patógenos sobrevivan en entornos hostiles, se dispersen y colonicen nuevos nichos no previstos. En lo relativo a la infección fúngica de gravedad, aún hoy constituye un gran reto para la salud pública por su elevada morbi-mortalidad a pesar de los avances en diagnóstico y estrategias de tratamiento. Para avanzar en el conocimiento de los procesos que motivan la invasión fúngica, los modelos in vitro de biofilm constituyen una herramienta interesante para hallar respuestas que puedan trasladarse y aplicarse en la práctica clínica. En el laboratorio de Referencia e Investigación en Micología, del CNM-ISCIH mantenemos una línea de investigación, utilizando un modelo de biofilm de *Aspergillus fumigatus*, y cepas de diferentes orígenes y fondos genéticos, que nos ayudarán a desarrollar herramientas complementarias para establecer nuevos test diagnósticos y estrategias de tratamiento, así como relacionar resistencia con la capacidad de formar biofilms y con la patogenia y virulencia del hongo. En este estudio se analiza fenotípicamente esta estructura mediante técnicas de imagen basadas en microscopia de fluorescencia con marcajes específicos para evaluar la arquitectura del biofilm intraespecie y el efecto de factores que puedan alterar su desarrollo e integridad.

Palabras Clave: *Aspergillus fumigatus*, Biofilm, Gliotoxina, Quorum Sensing, Matriz Extracelular.

Abstract: Biofilm-associated disease is being evaluated in depth in different fields of Clinical Microbiology, as it represents an important public health problem. The formation of biofilms constitutes a mode of growth that makes forming cells less susceptible to antimicrobials and to the action of the host's immune system. This structure also allows pathogens to survive in hostile environments and disperse and colonize new unforeseen niches. Regarding serious fungal infection, even today it constitutes a great challenge for public health due to its high morbidity and mortality despite important advances in diagnosis and treatment strategies. In an attempt to advance our knowledge on fungal cell invasion, in vitro fungal biofilm models are an interesting tool to find answers that can be applied in clinical practice. At the CNM-ISCIH Reference and Research Laboratory in Mycology, we maintain a line of research, using an *Aspergillus fumigatus* biofilm model, and strains from different origins and genetic backgrounds, which will help us develop new complementary tools to establish new diagnostics tests and treatment strategies, as well as to connect resistance to biofilms and to fungal virulence traits. In this study, this structure is phenotypically analysed using imaging techniques based on fluorescence microscopy with specific

markings to evaluate the architecture of the intraspecies biofilm and the effect of factors that may alter its development and integrity.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, Biofilm, Gliotoxin, Quorum Sensing, Extracellular Matrix.

1. Introducción

De las infecciones humanas, más de la mitad están relacionadas con la formación de biofilms simples o mixtos que actúan como reservorio de microorganismos, son difíciles de eliminar y a menudo se asocian con procesos recidivantes. En lo relativo a la infección fúngica de gravedad, aun hoy constituye un gran reto para la salud pública por su elevada morbi-mortalidad a pesar de los importantes avances en diagnóstico y estrategias de tratamiento.

En un intento de encontrar la causa de la falta de eficacia de los tratamientos antifúngicos, así como avanzar en el conocimiento de los procesos que motivan la invasión de la célula fúngica, los modelos de biofilms in vitro constituyen una herramienta interesante para hallar respuestas que puedan trasladarse y aplicarse en la práctica clínica.

Muchos de los estudios sobre biofilms fúngicos se centran en la especie *Aspergillus fumigatus*, causa frecuente de enfermedad invasiva grave en individuos de riesgo. *A. fumigatus* utiliza diferentes estrategias de evasión para evitar la respuesta protectora inmune e invadir al huésped susceptible, o resistir a la acción de los antifúngicos. Entre ellas, la formación de biofilms se ha propuesto como un mecanismo importante en la patogenia de este hongo filamentoso, y son objeto de recientes investigaciones. Aunque se han encontrado diferencias en el genotipo y el fenotipo de la células fúngica que se encuentran formando biofilm (c. sésiles) en comparación con las células planctónicas, tales diferencias no explican algunos comportamientos anómalos [1]. El modelo del biofilm como estrategia de adaptación consideramos que constituye un modelo interesante para profundizar en aspectos de la patogenicidad y resistencia de este hongo filamentoso.

El estudio de estas comunidades complejas, y en particular su arquitectura permitirá avanzar en el conocimiento de estrategias de tratamiento dirigido a esta forma de organización microbiana. Estudios previos determinan que la formación de un biofilm de *A. fumigatus* tiene lugar en diferentes etapas. La adhesión de las conidias al sustrato sucede en las primeras 4 horas (adhesión). Entre las 8 y 12 horas de incubación se produce la germinación de conidias en hifas ramificadas, iniciándose la anastomosis de hifas adyacentes (iniciación), que entre las 16 y 20 horas se extienden formando redes (biofilm inmaduro). A partir de las 24 horas se da la maduración del biofilm (biofilm maduro), con una evidente expansión y desarrollo del micelio, apareciendo las redes de hifas más compactas, con una elevada disposición estructural, y aumento de la matriz extracelular hidrofóbica (MEC) que une cohesivamente las hifas [2]. Esta MEC es imprescindible para la supervivencia y morfogénesis de la célula fúngica, proporciona una barrera protectora tanto frente a las condiciones ambientales como frente a otros microorganismos y en el caso de los hongos patógenos como *A. fumigatus* desempeña un papel activo en la patogenicidad e infección, ya que alberga componentes que constituyen importantes factores de virulencia. Además, participa también en la formación del biofilm [3].

La línea de investigación que desarrollamos en el LRIM va dirigida al estudio del modelo de biofilm de la especie *A. fumigatus*, pues constituye una herramienta imprescindible por su importancia biológica.

En este trabajo se analizará fenotípicamente esta estructura mediante técnicas de imagen basadas en microscopía de fluorescencia con marcajes específicos (blanco de calcoflúor, CFW) para evaluar la arquitectura del biofilm intraespecie y el efecto de factores que puedan alterar su desarrollo e integridad. Esta técnica se basa en la propiedad que tiene esta sustancia de emitir fluorescencia al ser activada por radiación ultravioleta, y por otra, en la afinidad que presenta por la quitina presente en la pared celular de los organismos fúngicos. El examen con blanco de calcoflúor está considerado como un método rápido y fácil para la caracterización de la célula fúngica. El desarrollo que las técnicas de imagen han experimentado en los últimos años permite que estrategias como estas supongan un importante avance en el conocimiento de estas estructuras.

2. Material y Métodos

2.1 Cepas de *Aspergillus sp.* y mantenimiento en el laboratorio

Se utilizaron hasta 8 cepas diferentes de *Aspergillus fumigatus* para los diferentes ensayos. Se incluyeron: la cepa de referencia ATCC 2004305 (American Type Culture Collection), denominada en este trabajo como "Af2580"; la cepa de referencia "Af293" aislada de un paciente con AI [4]; 3 aislados clínicos ["Af9160" (CM9160), "Af119" (CM10236), "Af135" (CM10240)] y 3 aislados ambientales ["Af122" (CM10239), "Af126" (CM10247), "Af127" (CM10248)] procedentes de la colección del Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología (LRIM). Las cepas se subcultivaron en Agar Patata Dextrosa (APD, OXOID, España) a 30 °C.

2.2 Preparación de inóculos

Para cada una de las cepas se prepararon suspensiones de conidios (esporas) a una concentración del orden de 10^8 ufc/mL (ufc, unidades formadoras de colonias). Para ello, pasados unos 6-7 días de incubación, se cubrió la superficie del cultivo esporulado en APD con aproximadamente 2 mL de agua+Tween 20 (Sigma-Aldrich®, Madrid, Spain) al 0,1% y se raspó suavemente con un hisopo estéril para liberar las esporas. La solución resultante (formada por esporas, agua y Tween 20 al 0,1%) se trasladó a un tubo estéril y se realizaron dos diluciones, 1/10 y 1/100; a partir de esta última se calculó el número de esporas (ufc) contenidas en la solución madre mediante recuento microscópico en cámara de Neubauer (Cellometer® Nexcelom Bioscience LLC, Estados Unidos).

Los inóculos ajustados se conservaron a 4 °C para su posterior utilización. Se prepararon nuevas suspensiones de trabajo cada cuatro semanas.

2.3 Desarrollo *in vitro* de un biofilm de *Aspergillus fumigatus*

Se partió de las suspensiones de conidios (10^8 ufc/mL, apartado 2.2.) de las distintas cepas para preparar un inóculo ajustado a 2×10^4 ufc/mL. Los biofilms se formaron en placas de microdilución de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano (Falcon®). En cada pocillo se añadieron 100 μ L de RPMI 2% glucosa tamponada con MOPS (Sigma-Aldrich®) y 100 μ L de inóculo (inóculo final 1×10^4 ufc/mL). Las placas se incubaron en la estufa a 37 °C durante periodos de tiempo seleccionados.

2.4 Caracterización de la estructura de los Biofilms mediante la observación con microscopio de fluorescencia y tinción con Calcofluor White (CFW)

Los biofilms formados durante 6, 24, 48 y 72 horas se fijaron con paraformaldehído (PFA). Para ello, en cada tiempo establecido se retiró el medio y se lavó la placa con PBS. Posteriormente se añadieron 200 μ L por pocillo de PFA 4%, manteniéndolo durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Pasados los 30 minutos, se retiró el PFA y se realizó un lavado con 200 μ L de PBS. Se realizó la tinción con CFW, un fluorocromo no específico que se une a polisacáridos 1-4 beta de quitina de la pared celular. Se añadieron 200 μ L/pocillo de CFW en PBS (10 μ g/mL) y posteriormente se incubó la placa durante 30 minutos en oscuridad a 37 °C, tiempo tras el cual se lavaron los pocillos tres veces con PBS. Las estructuras marcadas se visualizaron por microscopía de fluorescencia con el microscopio Leica Thunder (Leica Microsystems®). Todas las fotos se tomaron con el objetivo 10X.

2.5 Efecto de la adición de distintas moléculas en la estructura de del biofilm

La presencia de moléculas exógenas o derivadas de otros microorganismos que puedan compartir nicho ecológico con *Aspergillus*, puede tener implicaciones en el desarrollo del biofilm. En este estudio analizamos tres compuestos (diferentes concentraciones) con efectos conocidos o previstos en la estructura final del biofilm maduro. Para estudiar este efecto seleccionamos tres cepas de *A. fumigatus* (Af 2580, Af293 y Af9160). Los biofilms formados durante 24 horas, y sometidos a la acción de los distintos compuestos y condiciones descritas en la Tabla I, se fijaron con

paraformaldehído (PFA) y se procesaron como se describe en el apartado anterior para el estudio con microscopía de fluorescencia.

Tabla I Detalle de los compuestos evaluados para describir el efecto en la arquitectura de *A. fumigatus*

	Biofilm preformado	Tiempo de incubación con el compuesto	Tiempo de incubación total
Gliotoxina (20 µg/ml)	24h	24h	48h
DNAsa I (0,5 y 5 mg/ml)	24h	24h	48h
Autoinductor, AI-2 (4,3 y 0,54 µg/ml)	24h	24h	48h

¹ DNAsaI: Desoxirribonucleasa I de páncreas bovino DN25 (Sigma Aldrich)

3. Resultados

3.1 Estructura microscópica del biofilm marcado con Calcofluor White (CFW)

En la Figura 1 se muestra la estructura microscópica de los biofilms de 8 cepas seleccionadas marcados con CFW en distintos puntos temporales, que corresponden con distintas fases de maduración: adhesión (t=6h), y biofilm maduro (t=24h y t=48 h).

Tras las primeras 6 horas de incubación se observan conidios adheridos al fondo de la placa en todas las cepas evaluadas. Aumentando el tiempo de incubación, las hifas se alargan y entrelazan, de forma que la estructura adquiere una forma de maraña más compacta según se incrementa el tiempo de incubación (t=24 y t=48h). En todas las cepas se observa cómo las hifas forman un entramado que es más denso y reticulado cuanto más maduro es el biofilm.

3.2 Efecto de la adición de distintas moléculas en la estructura del biofilm

La adición de gliotoxina (GT), Autoinductor 2 (AI-2) y DNAsa en el biofilm formado mostró un efecto concentración dependiente. En la Figura 2 se representan imágenes seleccionadas del efecto de las concentraciones mayores ensayadas sobre un biofilm maduro (t=24h) comparativamente con el mismo biofilm desarrollado tras 48h de incubación en ausencia de tratamiento. La densidad y grado de reticulación del biofilm crecido durante 48h es similar para las tres cepas (A, E, I) en las condiciones ensayadas. La adición de estos compuestos muestra un efecto compatible con pérdida de integridad del biofilm, observándose un micelio desestructurado, disgregación (espacios libres de hifas y señal de fluorescencia), disminución en la densidad del entramado y una distribución heterogénea de la señal de fluorescencia (con agrupaciones más densas organizadas a lo largo del entramado) en comparación con la estructura del biofilm maduro de 48h de crecimiento, más uniforme en la intensidad del marcaje. Aunque no podemos cuantificar el efecto de cada una de las moléculas, y tampoco analizarlo comparativamente, el tratamiento con DNAsa I parece indicar un cambio mayor en distribución de la quitina en la pared celular de las hifas, más irregular y difusa.

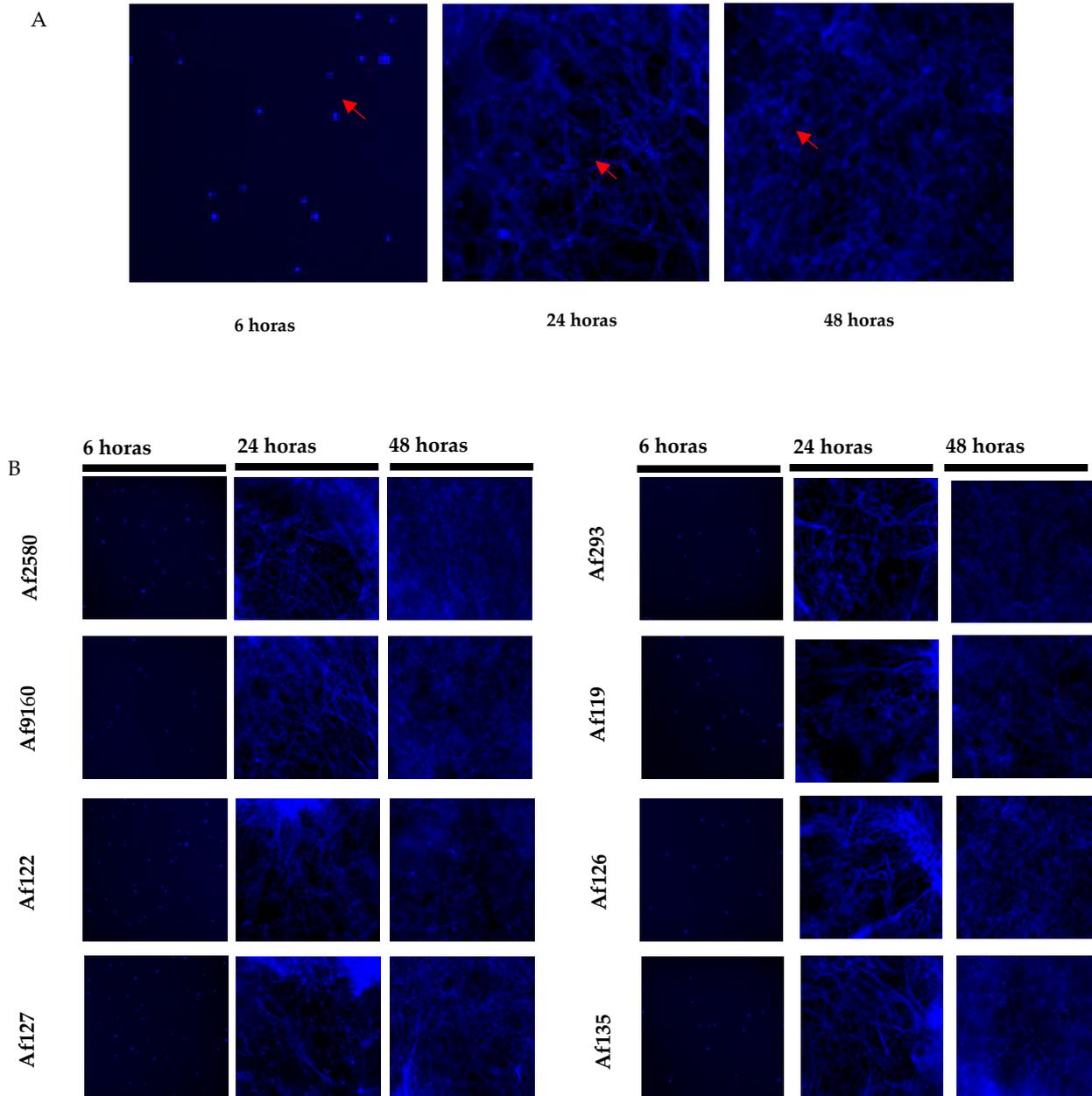


Figura 1 (A) Detalle de las estructuras marcadas con CFW del biofilm en los distintos puntos temporales evaluados en este estudio. Las flechas indican las esporas fijadas en $t=6$ h y detalle de las hifas ramificadas ($t=24$ h) y densamente entrelazadas ($t=48$ h). **(B)** Imágenes seleccionadas correspondientes a biofilms formados por las distintas cepas. Leica Thunder (Leica Microsystems®), objetivo 10X.

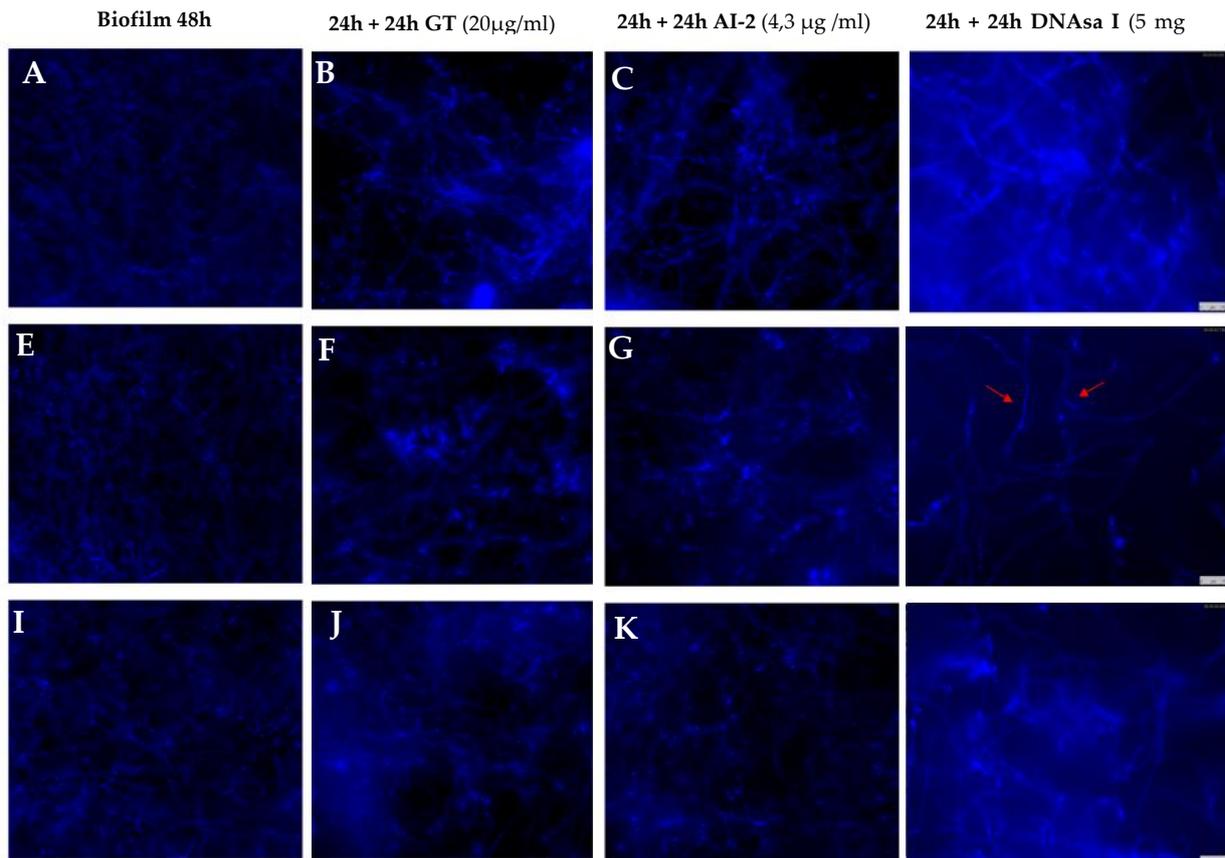


Figura 1 A, E y I; Estructura del biofilm crecido a tiempo 48h, a partir de un inóculo 10^4 ufc/ml, de las cepas Af293, CM2580 y CM9160, respectivamente. B, F y J; Estructura del biofilm crecido a tiempo 48h, incubado durante las últimas 24h en presencia de GT (20 μ g/ml). C, G y K; Estructura del biofilm crecido a tiempo 48h, incubado durante las últimas 24h en presencia de AI-2 (4.3 μ g/ml). D, H y L; Estructura del biofilm crecido a tiempo 48h, incubado durante las últimas 24h en presencia de la enzima DNAsa, de las cepas Af293, CM2580 y CM9160, respectivamente. Leica Thunder (Leica Microsystems®), objetivo 10X.

4. Discusión

Los primeros modelos de biofilms estudiados las consideraban estructuras relativamente homogéneas que consisten en una matriz extracelular con células incrustadas en su interior. El desarrollo de técnicas de imagen avanzadas ha permitido profundizar en la caracterización de la estructura de estas formaciones [5]. En el modelo de biofilm fúngico desarrollado en este trabajo fueron evaluadas la arquitectura microscópica de cepas diferentes de la especie *A. fumigatus*. Se incluyeron 2 cepas de referencia (Af2580, Af293), tres aislados clínicos (Af9160, Af119, Af135) y tres aislados ambientales (Af122, Af126, Af127) con el objetivo de caracterizar la capacidad de formar estas estructuras y estudiar la variabilidad fenotípica intraespecie.

Nuestros resultados demuestran que todas las cepas estudiadas, de origen clínico y ambiental, tiene la capacidad de formar biofilms en las condiciones controladas descritas en este trabajo, pero no hay evidencia de que la estructura del biofilm (arquitectura) sea significativamente distinta entre unas cepas y otras. Es importante destacar que estudios previos han demostrado que el biofilm sigue unas fases en su proceso de desarrollo y que, este desarrollo puede condicionar la capacidad patogénica del hongo. Como describen Morelli y col., a mayor madurez del biofilm de *A. fumigatus*, la virulencia se incrementa en tanto que aumenta la capacidad de evasión de la respuesta inmune y la actividad antifúngica se reduce [6]. Según estos autores la maduración del biofilm se relaciona con la densidad del entramado y composición de la matriz extracelular, que actuarían como una barrera física que impide la penetración del antifúngico y la acción de reconocimiento de las células inmunes. En esta línea, algunos autores han sugerido en estudios previos que la variabilidad intraespecie en *A. fumigatus* conlleva diferencias en la capacidad patogénica [7, 8]. Si bien, otros como el descrito por Puértolas-Balint y col., no encuentran diferencias en virulencia entre cepas cuando se analizan aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* [9]. estas discrepancias pueden estar relacionadas con la capacidad de formar biofilms y con la fase de desarrollo del mismo en la que se evalúa el efecto virulento.

La estructura del biofilm que se forma cambia con el tiempo y está determinada por muchos factores. Entre ellos las propiedades de la superficie, el número y la distribución inicial de las células sobre la superficie, la transcripción de sus genes, la interacción entre las células, así como las propiedades físicas y químicas del ambiente externo.

En las condiciones controladas de laboratorio ensayadas, las cepas evaluadas muestran un comportamiento similar en lo relativo a la formación de biofilm y su estructura. En estas mismas condiciones, observamos un efecto dependiente de la concentración, al adicionar distintas moléculas con efectos conocidos o previstos en la estructura final del biofilm maduro.

Gliotoxina (GT) es un metabolito secundario que se genera durante el desarrollo de *A. fumigatus*. Constituye un importante factor de virulencia de esta especie por su efecto citotóxico frente a las células inmunes. Además, se ha demostrado que tiene efectos tóxicos sobre la misma célula fúngica, de modo que *Aspergillus* tiene la capacidad de regular su síntesis mediante mecanismos de detoxificación. La adición de GT exógena en el biofilm formado ha demostrado tener un efecto en la estructura micelial, compatible con pérdida de integridad del biofilm, similar en las cepas analizadas. La adición de gliotoxina exógena sí se ha relacionado con cambios en la expresión de genes del cluster biosintético, especialmente de GliT, implicado en los mecanismos de la detoxificación de GT tóxica para el hongo [10]. La toxicidad de esta molécula se atribuye al puente disulfuro intramolecular que constituye el motivo funcional de todas las epipoliodioxopiperazinas (ETP), responsable de la inhibición de la actividad de proteínas con grupos tiol libres, como la NADH deshidrogenasa, así como la vía del factor NF- κ B y la respuesta innata de macrófagos, modulando la respuesta inmune a induciendo apoptosis en diferentes tipos celulares[11]. La adición de GT exógena muestra un efecto compatible con pérdida de integridad del biofilm, observándose un micelio desestructurado, disgregado de menor densidad, y sugiere un efecto tóxico sobre proteínas de la MEC, que requiere confirmación mediante técnicas alternativas.

Igualmente, uno de los mecanismos por los que estas comunidades coordinan su acción es el sistema denominado "Quórum Sensing"(QS)[12]. En el caso de especies de *Aspergillus* se ha observado como esta forma de comunicación celular hace que se modifiquen parámetros como la tasa

de crecimiento, morfología y concentraciones inhibitorias de algunos antifúngicos[6]. En este estudio se ha evaluado el efecto de AI-2 (dihidroxi pentanodiona, DPD), una molécula de comunicación bacteriana universal, para evidenciar su posible implicación en el control y desarrollo de biofilm mixtos (hongos-bacteria), dada la frecuencia con la que *Aspergillus* comparte nicho ecológico con ciertas bacterias. Los resultados obtenidos muestran un efecto concentración dependiente en la estructura del biofilm maduro, observándose un micelio desestructurado, de menor densidad, y desorganizado (marcaje irregular con CFW). Iwahashi y col. demostraron que el tratamiento de un biofilm preformado de *Aspergillus* con *Streptococcus pneumoniae* supuso la fragmentación del micelio y desaparición de la MEC, que avanzaba con el tiempo de tratamiento. El sobrenadante del cultivo neumocócico contenía actividad de fragmentación del micelio corroborando la implicación de un factor liberado al medio por la bacteria [13].

Por otro lado, el DNA extracelular que se encuentra en la MEC se sabe que es un componente importante del biofilm, pues contribuye a la estabilidad y mantenimiento de su estructura y regula la resistencia antifúngica [14, 15]. Aunque existen pocos datos sobre su presencia y contribución en biofilm de *A. fumigatus*, recientemente se ha demostrado la presencia de DNA en las últimas etapas del desarrollo del biofilm, aportándole un papel funcional en la estabilidad [15, 16]. Los estudios de disgregación con DNAsa corroboran la presencia de DNA extracelular en el biofilm maduro de las cepas evaluadas y aunque no se evidencian diferencias entre cepas con esta metodología, establece estrategias para favorecer la disgregación y avanzar en la investigación de esta estructura.

5. Conclusiones

Los hallazgos descritos en este trabajo ponen de manifiesto la capacidad de diferentes cepas de *Aspergillus fumigatus* para formar biofilms, bajo condiciones controladas de laboratorio.

La técnica de marcaje con CFW y microscopía de fluorescencia ofrece una visión simplificada y rápida de la estructura del biofilm de diferentes cepas de *A. fumigatus*, que necesita ser ampliada con la utilización de otros marcadores que nos permitan visualizar otras estructuras para confirmar la variabilidad intraespecie en la estructura del biofilm. La utilización de otras técnicas analíticas permitirá confirmar la composición diferencial de estas estructuras, según la cepa y las condiciones de cultivo.

La investigación con diferentes moléculas que pueden tener un papel en el desarrollo del biofilm nos permite avanzar en la caracterización de estrategias de disgregación y profundizar en el conocimiento de mecanismos reguladores.

Además, sería interesante completar estos resultados preliminares llevando a cabo estudios con otras cepas de *A. fumigatus* y otras especies fúngicas.

Agradecimientos: Este estudio contó con el apoyo del Fondo Español de Investigación Sanitaria a través de la Convocatoria competitiva Acción Estratégica en Salud (AESi2021, número de referencia PI21CIII/00012, MPY 435/21).

Contribución de los autores: conceptualización, A.G.L; metodología, C.F.F. , Ll.M.P. y R.S.L.; análisis formal, A.G.L; curación de datos, A.G.L., C.F.F. , Ll.M.P. y R.S.L.; redacción - preparación del borrador original, C.F.F. , Ll.M.P. y R.S.L; redacción-revisión y edición, A. G-L. Todos los autores han leído y aceptado la versión enviada del manuscrito.

Conflictos de Intereses: Los autores no declaran conflicto de intereses". Los patrocinadores fundadores no tenían ningún papel en el diseño del estudio; en la colección, análisis o interpretación de los datos; en la escritura del manuscrito y en la decisión de publicar los resultados.

Abreviaturas

Las siguientes abreviaturas son usadas en este manuscrito:

Af – *Aspergillus fumigatus*

ATCC – Colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection)

CFW – Calcofluor White

GT – Gliotoxina

LRIM – Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología

MEC – Matriz extracelular (Extracellular matrix)

PBS – Tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)

PFA – Paraformaldehído

UFC – Unidades formadoras de colonias;

DOAJ: Directory of open access journals

Referencias Bibliográficas

1. Schuster, J.J. and G.H. Markx, Biofilm architecture. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2014. 146: p. 77-96.
2. Kaur, S. and S. Singh, Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, 2014. 52(1): p. 2-9.
3. Beauvais, A. and J.P. Latge, *Aspergillus* Biofilm In Vitro and In Vivo. *Microbiol Spectr*, 2015. 3(4).
4. Pain, A., et al., Insight into the genome of *Aspergillus fumigatus*: analysis of a 922 kb region encompassing the nitrate assimilation gene cluster. *Fungal Genet Biol*, 2004. 41(4): p. 443-53.
5. Beyenal, H., Z. Lewandowski, and G. Harkin, Quantifying biofilm structure: facts and fiction. *Biofouling*, 2004. 20(1): p. 1-23.
6. Morelli, K.A., J.D. Kerkaert, and R.A. Cramer, *Aspergillus fumigatus* biofilms: Toward understanding how growth as a multicellular network increases antifungal resistance and disease progression. *PLoS Pathog*, 2021. 17(8): p. e1009794.
7. Blachowicz, A., et al., Contributions of Spore Secondary Metabolites to UV-C Protection and Virulence Vary in Different *Aspergillus fumigatus* Strains. *mBio*, 2020. 11(1).
8. Kowalski, C.H., et al., Heterogeneity among Isolates Reveals that Fitness in Low Oxygen Correlates with *Aspergillus fumigatus* Virulence. *mBio*, 2016. 7(5).
9. Puertolas-Balint, F., et al., Revealing the Virulence Potential of Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates Using Whole-Genome Sequencing. *Front Microbiol*, 2019. 10: p. 1970.
10. Schrettl, M., et al., Self-protection against gliotoxin--a component of the gliotoxin biosynthetic cluster, GliT, completely protects *Aspergillus fumigatus* against exogenous gliotoxin. *PLoS Pathog*, 2010. 6(6): p. e1000952.
11. Scharf, D.H., et al., Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012. 93(2): p. 467-72.
12. Decho, A.W., R.S. Norman, and P.T. Visscher, Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends Microbiol*, 2010. 18(2): p. 73-80.
13. Iwahashi, J., K. Kamei, and H. Watanabe, Disruption of *Aspergillus fumigatus* biofilm by *Streptococcus pneumoniae*: Mycelial fragmentation by hydrogen peroxide. *J Infect Chemother*, 2020. 26(8): p. 831-837.
14. Martins, M., et al., Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses*, 2012. 55(1): p. 80-5.
15. Rajendran, R., et al., Extracellular DNA release acts as an antifungal resistance mechanism in mature *Aspergillus fumigatus* biofilms. *Eukaryot Cell*, 2013. 12(3): p. 420-9.
16. Shopova, I., et al., Extrinsic extracellular DNA leads to biofilm formation and colocalizes with matrix polysaccharides in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol*, 2013. 4: p. 141.



© 2022 por los autores; Esta obra está sujeta a la licencia de Reconocimiento 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.