

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E
PATOLOGIA

VOLMIR PITT BENEDETTI

**ISOLADOS DE *CANDIDA* PROVENIENTES DE PACIENTES DIABÉTICOS E
TRANSPLANTADOS RENAI: ANÁLISE FILOGENÉTICA, AVALIAÇÃO DA
RESISTÊNCIA AO FLUCONAZOL E POLIMORFISMO DO GENE *ERG11***

CURITIBA - PR

2014

VOLMIR PITT BENEDETTI

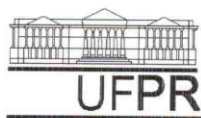
**ISOLADOS DE *CANDIDA* PROVENIENTES DE PACIENTES DIABÉTICOS E
TRANSPLANTADOS RENAIIS: ANÁLISE FILOGENÉTICA, AVALIAÇÃO DA
RESISTÊNCIA AO FLUCONAZOL E POLIMORFISMO DO GENE *ERG11***

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação *Stricto Sensu* em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia
da Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial para obtenção do título
de Doutor em Microbiologia.

Orientação: Dra. Chirlei Glienke.

CURITIBA - PR

2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Isolados de *Candida* provenientes de pacientes diabéticos e transplantados renais: análise filogenética, avaliação da resistência ao fluconazol e polimorfismo do gene *ERG11*”

Por

VOLMIR PITT BENEDETTI

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Prof^ª. Dr^ª. Chirlei Glienke (presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Giseli Klassen

Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Kava-Cordeiro

Prof. Dr. Sideney Becker Onofre

Dr^ª. Caroline Elise Waculicz Andrade

Curitiba, 30 de setembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à Andréa, meu amor, minha alma gêmea, minha esposa, amiga e companheira desta vida. Aquela que sempre esteve ao meu lado, apoiando, incentivando e contribuindo para que eu conseguisse realizar os meus sonhos. Obrigado por você fazer parte da minha história, pois sem você ao meu lado *eu não seria eu.*

AGRADECIMENTOS

À professora Doutora Chirlei Glienke, pela inestimável contribuição para minha formação científica, pelo carinho, competência e simplicidade, pela amizade que construímos nestes quatro anos e, especialmente, pela confiança depositada.

À UNIVERSIDADE PARANAENSE, na pessoa de seu diretor professor Claudemir de Souza, pelo incentivo pessoal e pela concessão de bolsa institucional.

Aos Coordenadores e professores dos Cursos de Enfermagem, Estética e Cosmetologia, Ciências Biológicas, Farmácia, Nutrição e Odontologia, pela amizade, apoio e compreensão nas inevitáveis ausências ao longo do doutorado.

Aos colegas do LABGEM pelo aprendizado, paciência e companheirismo em tantos momentos que solicitei ajuda e nunca me foi negada.

Ao técnico do LABGEM Rodrigo Aluizio pela ajuda em tantos momentos durante esta longa jornada, seu auxílio foi extremamente importante, graças a sua ajuda consegui fazer as análises filogenéticas dos meus isolados.

Ao amigo Jomar Francisco de Moraes, à prima Fabiane Meotti Niclote e à minha sobrinha Allana Maciel Benedete, que me acolheram em suas casas nas viagens a Curitiba. À Neusa Martins, por ter aberto as portas de sua clínica para minhas pesquisas e partilhado seu conhecimento prático.

Aos meus queridos alunos, que incentivam a busca incessante de atualização, especialmente aqueles de iniciação científica que auxiliaram na coleta do material biológico e isolamento dos microrganismos.

À minha família, em especial minha esposa Andréa, pela dedicação, incentivo, compreensão e por ser companheira de todas as horas.

Aos meus filhos, razão maior de minha luta, que inspiram com sua inocência e amor incondicional.

Por fim, aos meus amigos que souberam compreender meus conflitos e minha ausência nos anos ao longo dos quais me dediquei a este projeto.

RESUMO

O considerável aumento das infecções fúngicas causadas por agentes oportunistas conferiu significativa importância a estas patologias nos últimos anos. Os principais fatores associados a esta patologia se relacionam a alterações na resposta imunológica do paciente. Entre os fungos oportunistas destacam-se as leveduras do gênero *Candida*, que possuem distintos mecanismos de virulência e expressiva variabilidade genética. O tratamento da candidíase tornou-se um grande desafio diante do aumento da resistência destas leveduras e o pequeno número de drogas disponíveis para terapêutica. Entre os distintos mecanismos de resistência das leveduras *Candida* spp, destacam-se as bombas de efluxo e as alterações mutacionais no gene *ERG11*. Neste contexto, foi realizada a investigação do polimorfismo no gene *ERG11* de isolados de leveduras *Candida* spp e a correlação com o padrão de suscetibilidade ao antifúngico fluconazol. Para tanto, foram isolados 120 leveduras da saliva de pacientes diabéticos, transplantados renais e pessoas saudáveis, totalizando 190 indivíduos. Foram realizados testes de suscetibilidade por meio do E-test®, segundo o documento M44-A2 (CLSI), para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ao Fluconazol. Para a identificação das espécies *Candida* spp amplificou-se por PCR, fragmentos do gene 28S do rDNA e da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA. Para a análise do polimorfismo do gene *ERG11*, amplificou-se fragmentos utilizando-se *primers* específicos para cada espécie de *Candida* spp. Os resultados encontrados demonstram que os pacientes diabéticos foram os mais colonizados por leveduras, com 68,75% de isolamento, seguidos dos transplantados com 51,35%. A espécie *Candida albicans* foi a espécie mais isolada, compondo 66,7% dos isolados, pertencentes a seis grupos populacionais. As mutações no gene *ERG11* foram 82,8% (121) sinônimas e 17,1% (25) de sentido trocado, identificadas como F105L, D116E, K119N e S137L em *C. albicans*, e T224C e G263A em *C. tropicalis*. As mutações encontradas no gene *ERG11* não influenciaram no padrão de suscetibilidade ao fluconazol. Desta forma, os pacientes diabéticos foram os mais colonizados por leveduras, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente e a que apresentou maior diversidade genética. O polimorfismo encontrado nos fragmentos do gene *ERG11* não provocou diminuição no padrão de suscetibilidade dos isolados frente ao antifúngico fluconazol.

PALAVRAS-CHAVE: Transplantados; *C. albicans*; Fluconazol; *ERG11*.

ABSTRACT

ISOLATED OF *Candida* FROM DIABETIC AND RENAL TRANSPLANTED PATIENTS: ANALYSIS PHYLOGENETIC, FLUCONAZOL RESISTANCE, AND GENE *ERG11* POLYMORPHISM

The considerable increase in fungal infections caused by opportunistic agents attributed significant importance to these infections in recent years. The main factors associated with this disease are related to changes in the patient's immune response. Among the opportunistic fungi are the yeasts of the genus *Candida*, which have different mechanisms of virulence and a high genetic variability. The treatment of candidiasis has become a major challenge before the increased resistance these yeasts and the small number of drugs available for treatment. Among the various resistance mechanisms of yeast *Candida* spp, we highlight the efflux pumps and mutational changes in the *ERG11* gene. In this context, the research was conducted the polymorphisms in *ERG11* gene isolated from yeast *Candida* spp and correlates with the susceptibility to Fluconazole. For this, 120 yeasts saliva of diabetic patients, kidney transplant recipients and healthy individuals were isolated. Susceptibility testing by the E-Test® were performed, according to the document M44-A2 (CLSI) for determination of MIC to Fluconazole. For the identification of the species *Candida* spp, fragments of 28S rDNA gene and regions ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA gene were amplified by PCR. For the analysis of polymorphism of *ERG11* gene, fragments using specific primers for each species of *Candida* spp were amplified. The results demonstrate that diabetic patients were the most colonized by yeast, with 68.75% of isolation, followed by transplanted with 51.35%. The species *Candida albicans* was the most frequent species, making up 66.7% of the isolated belonging to six population groups. Mutations in *ERG11* gene were 82.8% (121) silent and 17.1% (25) changed direction, identified as F105L, D116E, K119N and S137L in *C. Albicans*, and T224C and G263A in *C. tropicalis*. The mutations found in the *ERG11* gene did not influence the pattern of susceptibility to Fluconazole. It was demonstrated that diabetic patients were the most colonized by yeasts, being *C. albicans* the most frequent kind and the one which had the greatest phylogenetic variation. The polymorphisms found in the gene fragments *ERG11* did not caused decrease in the isolated front susceptibility to antifungal fluconazole standard.

KEYWORDS: Transplanted; *C. albicans*; Fluconazol; *ERG11*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. JUSTIFICATIVA	10
3. REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS.....	11
3.2 MICOSES OPORTUNISTAS	13
3.3 PACIENTES SUSCETÍVEIS	14
3.4 FUNGOS DO GÊNERO <i>Candida</i>	15
3.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	18
3.6 FATORES DE VIRULÊNCIA	19
3.7 DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ESPÉCIE DE <i>Candida</i> spp.....	20
3.8 EPIDEMIOLOGIA DAS LEVEDURAS <i>Candida</i> spp.....	21
3.9 FORMAS CLÍNICAS DA CANDIDÍASE	22
3.10 TRATAMENTO	25
3.11 FENÔMENO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS ENTRE AS LEVEDURAS <i>Candida</i>	25
3.12 CLASSES DE DROGAS ANTIFÚNGICAS	26
3.13 PADRÃO DE SUSCETIBILIDADE DE <i>Candida</i> ÀS DIFERENTES CLASSES DE ANTIFÚNGICOS	28
3.14 MECANISMO MOLECULAR	29
3.15 GENE <i>ERG11</i>	31
3.16 MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS <i>Candida</i>	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 OBJETIVOS GERAIS	34
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	36
5.1 ARTIGO 1- ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Candida</i> OBTIDOS DE PACIENTES DIABÉTICOS E TRANSPLANTADOS RENAIIS	36
5.2 ARTIGO 2 – POLIMORFISMOS DO GENE <i>ERG11</i> DE ISOLADOS DE <i>Candida</i> PROVENIENTES DE PACIENTES DIABÉTICOS E TRANSPLANTADOS RENAIIS	53
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICES	84
ANEXOS	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS AZÓIS PRESENTES EM <i>Candida albicans</i>	32
FIGURA 2	ÁRVORE FILOGENÉTICA DA ESPÉCIE <i>Candida albicans</i> UTILIZANDO AS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA.....	47
FIGURA 3	ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA DE <i>Candida</i> spp GERADA COM SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 E 28S DO rDNA.	48

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES COM ISOLAMENTO DE LEVEDURAS.....	43
TABELA 2	RELAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Candida albicans</i> PERTENCENTES A ESTE TRABALHO E OS ISOLADOS DE PESQUISAS REALIZADAS POR UNIVERSIDADES BRASILEIRAS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA.....	44
TABELA 3	POLIMORFISMO EM SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE <i>ERG11</i> DE <i>C. albicans</i> E <i>C. tropicalis</i> E SUA CORRELAÇÃO COM A SUBSTITUIÇÃO DE AMINO ÁCIDO DA <i>Erg11p</i>	59
QUADRO 1	SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 E GENE 28S DO DNA RIBOSSOMAL DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	40
QUADRO 2	PRIMERS QUE AMPLIFICAM FRAGMENTOS DO GENE <i>ERG11</i> DE <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> E <i>Candida tropicalis</i>	57

LISTA DE ABREVIações

5-FC	5-fluorocitosina
5-FU	5-fluorouracil
ABC	ATP-binding cassette
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNA	<i>Candida não-albicans</i>
Erg11p ou 14DM	Enzima lanosterol 14 α -demetilase
ITS	<i>Internal transcribed spacer regions</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rDNA	DNA Ribossomal
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
CIM	Concentração inibitória mínima
BHI	Brain heart infusion

1. INTRODUÇÃO

O aumento de infecções fúngicas nos últimos anos está relacionado a tipos específicos de pacientes, como no caso dos portadores do vírus HIV e desenvolvendo a AIDS, pessoas que se submetem a tratamento com drogas imunossupressoras, antibióticos de amplo espectro, transplantados de órgãos ou, ainda, que possuam doenças crônicas como diabetes. Este grupo de indivíduos, por apresentarem alterações na resposta imunológica, fornecem condições que favorecem o desenvolvimento de infecções fúngicas (Richardson, 2005; Wang *et al.*, 2009).

Estas infecções fúngicas são denominadas oportunistas e representam um grave risco à saúde destes pacientes, pois frequentemente podem levar o indivíduo a óbito. Entre os agentes mais frequentemente envolvidos nestas infecções, destacam-se as leveduras do gênero *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (Morschhäuser, 2010).

Ocorre que o principal fungo patógeno oportunista dos seres humanos é *Candida albicans*, um comensal do trato urogenital, gastrointestinal e da pele, que apresenta altas taxas de prevalência entre os indivíduos, podendo estar envolvida em um amplo espectro de infecções, como superficial, cutânea, subcutânea e até sistêmica (Kolaczowski, 2009). Entretanto, infecções causadas por outras espécies de leveduras do gênero *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* entre outras, tornaram-se cada vez mais frequentes (Kothavade, 2010).

As leveduras que compõem o gênero *Candida* possuem células eucariontes, com parede celular, são heterotróficas, possuem reprodução assexuada de forma clonal, sendo que algumas espécies como *C. albicans* são diplóides enquanto outras, como *C. glabrata*, são haplóides (Jacobsen *et al.*, 2008). Entre as mais de 200 espécies que compõem este gênero, apenas 20 são apontadas com envolvidas em infecções em humanos, destacando-se *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica* e *C. norvegensis* (Rodaki *et al.*, 2009).

Existe uma grande variabilidade genética entre as espécies de leveduras do gênero *Candida*, fato este verificado pela diferença de tamanho do genoma, onde algumas espécies o genoma é constituído por cromossomos dispostos aos pares como nas espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, enquanto

outras, como *C. glabrata*, possuem um genoma formado apenas por alguns cromossomos haplóides (Bougnoux *et al.*, 2006).

Entre outros aspectos que contribuem para a alta variabilidade entre as espécies que compõem este gênero está a alta taxa de recombinação genética observada em isolados clínicos de diferentes espécies e, ainda, o fato de algumas destas leveduras fazerem parte da microbiota endógena de diferentes sítios anatômicos do corpo humano, o que possibilita uma constante troca genética entre os microrganismos durante as migrações populacionais (Odds, Jacobsen, 2008; Wu *et al.*, 2012).

O aumento da frequência de infecções por este grupo de fungos tem sido agravado pelo surgimento de resistência às drogas antifúngicas, particularmente ao grupo dos azóis e, entre estes, ao fluconazol, droga amplamente utilizada no tratamento de paciente com infecção por *Candida* spp. A perda da suscetibilidade das leveduras *Candida* spp aos antifúngicos azólicos dificulta a elaboração da conduta médica e representa um grande obstáculo para a obtenção do sucesso terapêutico (Yan *et al.*, 2009).

Outro aspecto que tem agravado o tratamento das infecções por *Candida* spp é o pequeno número de drogas disponíveis no mercado, utilizadas para o tratamento destas patologias fúngicas. Apesar das pesquisas para a obtenção de novas substâncias com ação antifúngica, atualmente, poucas drogas são utilizadas no tratamento destas doenças. Dentre os medicamentos disponíveis estão os poliênicos, alilaminas, fluoropirimidinas, equinocandinas e os azóis (Colombo *et al.*, 2012).

Entre estas drogas antifúngicas, destaca-se o fluconazol, pertencente a classe dos azóis. Este antifúngico é uma das drogas mais frequentemente utilizadas na clínica médica, tendo sua indicação na profilaxia ou no tratamento da candidíase superficial (orofaríngea, esofágica ou vaginal) e na candidíase disseminada. No entanto, o uso generalizado de fluconazol tem sido associado ao surgimento de resistência em isolados clínicos de *Candida* spp. (Calabrese *et al.*, 2000; Znaidi *et al.*, 2009).

A resistência às drogas antifúngicas possui diferentes origens, podendo ser adquirida, como no caso da espécie *C. albicans*, que a manifesta após longa exposição ao fluconazol ou, naturalmente existente, como o caso de *C. krusei* que possui resistência intrínseca ao fluconazol (Cannon *et al.*, 2007). Ainda, outros

aspectos influenciam na resposta da célula fúngica às drogas, como o tipo de fungo, a dose do medicamento, a duração do efeito e o mecanismo de ação da droga (Sanglard *et al.*, 2003).

Alguns mecanismos são descritos como responsáveis pelo desenvolvimento de resistência ao fluconazol entre as leveduras *Candida*. Entre estes se destacam as bombas de efluxo do transportador ABC (ATP-binding cassette) e do facilitador principal (*Major Facilitator Superfamily-MFS*), que agem impedindo o acúmulo de droga dentro do citoplasma da célula. Ademais, são citadas como importantes mecanismos moleculares geradores de resistência as alterações conformacionais de enzimas que são alvo das drogas antifúngicas, a ativação de mecanismos que degradam fármacos no citoplasma da célula e, ainda, alterações cromossômicas em genes como o *ERG3*, *ERG11* e *FLU1* (Manoharlal, 2008; Marie, White, 2009).

As alterações genéticas no gene *ERG11* estão correlacionadas com a perda de suscetibilidade das leveduras *Candida* aos antifúngicos azóis. Isto ocorre devido a alteração do sítio de ligação do antifúngico à enzima-alvo *Erg11p* (lanosterol 14 α -demetilase), pois esta enzima é codificada por este gene (Maccallum *et al.*, 2010). Alterações na atividade da enzima *Erg11p* também podem ocorrer pelo aumento da expressão do gene *ERG11*, o que resulta em aumento da concentração da enzima no espaço intracelular, exigindo uma maior concentração do antifúngico para provocar a inibição da atividade enzimática (Goldman *et al.*, 2004).

Neste contexto de progressivo aumento de incidência das infecções fúngicas, associado à escassez de drogas disponíveis para o tratamento e à crescente perda de suscetibilidade dos fungos aos medicamentos antifúngicos, faz-se necessário aprofundar o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência das leveduras do gênero *Candida* às drogas antifúngicas, particularmente aos azóis e dentre estes, ao fluconazol. Entre os mecanismos aqui propostos, estudou-se aquele que envolve o polimorfismo do gene *ERG11* de modo a contribuir para o aprofundamento do conhecimento científico relativo à resistência.

2. JUSTIFICATIVA

O aumento da incidência de infecções fúngicas causadas por agentes oportunistas contribuiu para que estas adquirissem uma significativa importância ao longo das últimas décadas. É alto o índice de mortalidade associado a estas patologias porque atingem, particularmente, pacientes debilitados por outras situações patológicas, como no caso dos transplantados, portadores de câncer, sob terapia intensiva, indivíduos com AIDS, pessoas que fazem tratamento com drogas imunossupressoras, sob efeito de antibióticos de largo espectro ou ainda, que estejam recebendo nutrição parenteral.

Pacientes transplantados, desenvolvendo a AIDS, sob efeito de drogas imunossupressoras e diabéticos, entre outros, podem apresentar perda na eficiência da resposta imunológica contra agentes infecciosos, pois são mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças causadas por agentes oportunistas (Ruhnke, 2006). Alguns fungos comensais, como espécies de *Candida*, são os principais patógenos oportunistas que atingem os humanos.

Entre as 20 espécies do gênero *Candida* com potencial para causar infecção no homem, destaca-se a espécie *Candida albicans*, de singular importância. Esta é a espécie mais estudada, sendo a mais frequentemente envolvida em candidíase. Contudo, espécies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* estão sendo cada vez mais isoladas a partir de infecções fúngicas (Hiller *et al.*, 2011).

A singular importância que este grupo de leveduras exerce sobre as infecções fúngicas, deve-se ao maior poder de patogenicidade e ao grande número de fatores de virulência que estes microrganismos apresentam. Destacam-se a capacidade de aderência (adesinas), variabilidade genotípica e os mecanismos de resistência a drogas antifúngicas (Menezes *et al.*, 2007).

Diversas pesquisas buscam desenvolver novas drogas com ação antifúngica, mas os resultados são relativamente limitados. Atualmente, o tratamento contra infecções fúngicas em humanos se restringe a poucas classes de moléculas, destacando-se os polienos, os azólicos, fluoropirimidinas e equinocandinas (Kouidhi *et al.*, 2010). Entre estas drogas, os derivados azólicos são os mais importantes, pois se caracterizam como a escolha preferida entre as drogas antifúngicas, devido à sua alta biodisponibilidade e bom perfil de segurança (Manastir *et al.*, 2011).

A resistência das leveduras *Candida* aos antifúngicos, particularmente aos derivados azólicos, possui diferentes origens. Pode ocorrer resistência a partir do mecanismo que leva à incapacidade da célula de acumular a droga intracelular, exercido pelas bombas de efluxo do transportador ABC e do facilitador principal (MFS) (Holmes *et al.*, 2008). Outra forma é aquela desencadeada pela ação de mutação em pontos específicos do gene, como o que ocorre no gene *ERG11* (Yan, *et al.*, 2009).

As alterações mutagênicas em pontos específicos do gene *ERG11* são apontadas como um importante mecanismo de indução de resistência aos antifúngicos azólicos, principalmente ao fluconazol. Isto se deve ao fato de que este gene é responsável pela codificação da enzima lanosterol 14 α -Demetilase, foco de ação dos antifúngicos triazólicos. As mutações neste gene induzem mudanças pós-traducionais em sequências de aminoácidos, acarretando alterações na estrutura tridimensional da enzima lanosterol 14 α -Demetilase. Tais mudanças conformacionais podem provocar a perda de afinidade do antifúngico azólico ao sítio de ligação da enzima, o que gera resistência do fungo à droga (Wang *et al.*, 2009).

A investigação dos mecanismos que levam os fungos oportunistas do gênero *Candida* a perder a suscetibilidade a drogas antifúngicas, como ocorre no *ERG11* é um trabalho árduo que está longe de ser completamente concluído, pois existem importantes dúvidas que necessitam melhor investigação. Portanto, faz-se necessário uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos e bioquímicos desenvolvidos por este grupo de fungos, para que seja possível, em um futuro próximo, a elaboração de condutas terapêuticas adequadas para o tratamento de pacientes portadores de infecções fúngicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Características gerais dos fungos

O reino dos fungos engloba cerca de 1,5 milhões de espécies, sendo que deste total, apenas 200 têm sido associados com o homem (Buckley *et al.*, 2008). Os fungos podem habitar diferentes nichos no ambiente, caracterizados como um grupo variado de organismos, onde a maior parte é de vida livre, encontrados

abundantemente na natureza, sendo classificados como seres eucariontes e heterotróficos (San-Blas, Calderone, 2004; Murray *et al.*, 2006; Carmo *et al.*, 2007; Willey *et al.*, 2008).

Os fungos podem ser encontrados nas formas filamentosas ou como leveduras, sendo que alguns são denominados dimórficos, caracterizados por apresentarem as duas formas de crescimento no seu ciclo. Os fungos filamentosos são formados por conjuntos de hifas denominados micélio. As leveduras, por sua vez, são unicelulares de forma arredondada, possuem tamanho entre 2 a 60 μm , habitualmente reproduzem-se assexuadamente por gemulação e sexuadamente através da produção de artrósporos e basidiósporos (Forbes *et al.*, 2002).

Os fungos são, em sua maioria, microrganismos sapróbios que vivem à custa de restos orgânicos degradados. Alguns destes fungos coexistem com os seres humanos como comensais sem causar danos e outros são patógenos evidentes. Para poderem colonizar áreas corporais, estes microrganismos precisam superar e resistir aos mecanismos de resistência do hospedeiro. Certos fungos comensais, como espécies de *Candida*, são patógenos oportunistas que podem causar infecções, quando ocorrer depleção do estado imunológico do hospedeiro (Cannon *et al.*, 1995; Cannon *et al.*, 2009).

As infecções causadas por fungos são denominadas micoses. Estas infecções podem variar no tempo de duração e grau de patogenicidade no hospedeiro, estando subordinadas ao mecanismo de desenvolvimento do fungo. Podem ser classificadas segundo o nível de envolvimento nos tecidos e pela maneira de entrada no hospedeiro, sendo divididas em micose sistêmicas, subcutâneas, cutâneas, superficiais e oportunistas (Tortora *et al.*, 2012).

Dos 150 fungos que causam patologias em humanos, 20 pertencem ao gênero *Candida*. Este grupo de leveduras são normalmente patógenos oportunistas, causadores de infecções superficiais a sistêmicas, atingindo habitualmente pessoas imunocomprometidas, recém-nascidos ou que tenham sido expostas a tratamentos com antibióticos ou corticosteróides (Samaranayake, Hanes, 2011).

Algumas espécie de *Candida* spp apresentam singular importância, como *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Entretanto, *C. albicans* é a espécie mais importante, a mais estudada e frequentemente envolvida em infecções fúngicas, sendo o

principal agente etiológico da candidíase, atingindo os mais distintos sítios anatômicos do corpo humano (Hiller *et al.*, 2011).

Infecções fúngicas oportunistas são um grave problema de saúde, principalmente para pacientes imunocomprometidos. Entre os agentes mais frequentemente envolvidos neste tipo de infecção estão as leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* e os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (Arana *et al.*, 2010).

3.2 Micoses oportunistas

O aumento considerável da incidência de agentes oportunistas fez com que as infecções fúngicas adquirissem uma significativa importância ao longo das últimas décadas. As infecções oportunistas são geralmente causadas por fungo pouco ou não patogênico ao hospedeiro saudável, mas que se aproveitam de uma situação de *déficit* imunológico para romper o equilíbrio microbiano normal e expressar seu poder de patogenicidade (Souza *et al.*, 2007).

Fungos oportunistas comumente causam infecções superficiais, afetando pele ou mucosas. No entanto, alterações na imunidade do hospedeiro, ferimentos físicos ou a intervenção médica podem permitir que estes agentes acessem diferentes órgãos internos e tecidos, causando infecções potencialmente fatais (Enjalbert *et al.*, 2007; Leach *et al.*, 2011).

A violação das barreiras anatômicas ou mudanças nos mecanismos fisiológicos de defesa podem contribuir para o desenvolvimento do potencial patogênico destes fungos, acarretando diversos tipos de infecções com variados aspectos de manifestações clínicas, indo desde simples infecções de mucosa, como a candidíase oral ou vaginal, até situações mais graves, como quando o agente se dissemina pela corrente sanguínea e atinge órgãos internos (Chapman, Faix, 2003).

As infecções fúngicas representam um grande risco para a vida do paciente com quadro de deficiência imunológica. No que se refere ao hospedeiro, são duas as principais razões que explicam a complexidade da terapia: a incapacidade de resposta imunológica adequada contra o agente agressor e o reduzido número de drogas antifúngicas disponíveis para seu tratamento (Morschhäuser, 2010).

Os principais fungos patogênicos oportunistas dos seres humanos pertencem ao gênero *Candida*, principalmente a espécie *C. albicans*, levedura comensal do

trato urogenital, gastrintestinal e da pele (Rodaki *et al.*, 2009). Algumas espécies fazem parte da microbiota normal do homem, sendo encontradas como saprófitas em dobras da pele, orofaringe, mucosa vaginal e colonizam o trato gastrointestinal em até 80% de indivíduos saudáveis (Colombo, Guimarães, 2003; Barbedo, Sgarbi, 2010).

Portanto as leveduras deste gênero, particularmente a espécie *C. albicans* possuem grande capacidade de se propagar e infectar diferentes sítios anatômicos do hospedeiro humano. Um dos principais aspectos que justificam o sucesso deste patógeno no processo infeccioso, recai sobre a sua alta capacidade de resposta e adaptação às alterações ocorridas no seu microambiente (Zhou, Lorenz, 2008).

3.3 Pacientes suscetíveis

O crescente número de casos de infecções fúngicas oportunistas, pode ser atribuído ao aumento da frequência de pacientes submetidos a transplante de órgãos, em tratamento contra o câncer, sob terapia intensiva, fazendo uso de drogas imunossupressoras, recebendo nutrição parenteral, sob efeito de antibióticos de amplo espectro e, ainda, com AIDS (Ruhnke, 2006; Manastir *et al.*, 2009).

Os pacientes imunossuprimidos são altamente suscetíveis a infecções fúngicas, sendo uma importante causa de mortalidade neste grupo. Pacientes após quimioterapia, transplante de medula óssea ou com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), podem ter, com frequência, a penetração destes microrganismos na corrente sanguínea e o desenvolvimento de candidemia, infecção que pode ter um índice de mortalidade de aproximadamente 40% (Kouidhi *et al.*, 2010).

As infecções fúngicas sistêmicas são uma das principais causas da morte em pacientes com câncer, em indivíduos com neutropenia prolongada por transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) ou transplante de medula. Ainda, o tratamento de pacientes em faixas etárias mais altas e a quimioterapia que compromete a integridade do trato gastrointestinal favorecem este tipo de infecção (Segal *et al.*, 2007; Marr, 2008).

Pacientes que se submeteram a transplante de órgãos são constantemente acometidos por infecções fúngicas. Candidíase persistente nestes pacientes tem sido associada à hemodiálise, exposição a substâncias antimicrobianas de amplo

espectro, internação em unidade de terapia intensiva (UTI), insuficiência hepática aguda e a outros eventos cirúrgicos (Husain *et al.*, 2003; Kothavade *et al.*, 2010).

Ainda, outros pacientes que podem apresentar quadros de imunodeficiência, aumentando a suscetibilidade a infecções fúngicas oportunistas, são os portadores de doenças metabólicas como a diabetes, os que realizaram esplenectomia, pacientes desnutridos, com deficiência de zinco, alcoolistas, acometidos por infecções ou infestações e, ainda sob estresse crônico (Forte, 2004). Segundo Rodaki *et al.* (2009), o paciente diabético pode apresentar maior frequência de infecções fúngicas, pois quando *C. albicans* se expõe à glicose sérica, ela aumenta a sua resistência ao estresse osmótico (oxidativo e catiônico), o que pode protegê-la do ataque fagocitário pelos leucócitos.

3.4 Fungos do gênero *Candida*

Cientes da importância clínica da candidíase, cabe aprofundar o estudo deste grupo de leveduras. Neste sentido tem-se que as leveduras do gênero *Candida* compõem um grupo de aproximadamente 200 espécies, das quais apenas 20 são descritas como possíveis agentes etiológicos de candidíases (Sugita, Nishikawa, 2004). O grupo que compõe as principais espécies de interesse clínico é constituído pelas espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. No entanto, é frequente o relato de infecções superficiais e invasivas por espécies emergentes, como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvergensis*, *C. inconspicua*, *C. pseudorugosa*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* (Coleman *et al.*, 1998; Gonçalves *et al.*, 2010).

A maioria das infecções fúngicas em humanos são causadas pelas espécies *Candida albicans* e *Candida glabrata*, com taxas de prevalência de aproximadamente 70% e 15%, respectivamente (Ruhnke, 2006; Kolaczowski *et al.*, 2009). Em todas as partes do mundo, *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada, tanto de infecções superficiais como invasivas, estando associada às taxas de mortalidade mais elevadas (Carvalho, 2011). Esta levedura é um microrganismo comensal do trato urogenital, gastrointestinal e da pele, esta espécie comumente provoca infecções nas mucosas de indivíduos saudáveis, como a candidíase oral e vaginal (Hiller *et al.*, 2011). Contudo, infecções causadas por espécies de *Candida*

não-*albicans* (CNA), como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica* e *C. norvegensis* têm se mostrado cada vez mais frequentes, sendo em algumas situações predominantes (Ng *et al.*, 1998; Kothavade *et al.*, 2010).

Entres as espécies de *Candida* não-*albicans*, especial importância adquire *Candida glabrata* pela sua grande prevalência em infecções invasivas e superficiais, particularmente aquelas que atingem a mucosa oral, esôfago, vagina e trato urinário. Nas infecções sistêmicas *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são classificadas como a segunda e a terceira espécies mais frequentemente envolvidas em candidemias (Cannon *et al.*, 1995; Pfaller, Diekema, 2007).

A espécie *Candida glabrata* tem emergido como um importante patógeno hospitalar, principalmente em países da Europa, onde é o segundo agente mais envolvido em candidemias e nos Estados Unidos, onde ocupa a terceira posição. Já na América Latina, esta espécie é responsável por 5% a 8% das infecções na corrente sanguínea (Nucci *et al.*, 2010). Embora menos frequente que *C. albicans*, as infecções causadas por *C. glabrata* são mais difíceis de tratar e estão associadas a altas taxas de mortalidade. Este fato se deve à maior tolerância inata deste microrganismo aos antifúngicos azólicos. Outro aspecto epidemiológico atribuído a estas leveduras deve-se a sua maior prevalência em pacientes idosos (Kolaczowski *et al.*, 2009).

A levedura *Candida tropicalis* é um potencial agente oportunista quando o hospedeiro apresenta supressão da microbiota bacteriana, devido ao uso de antibióticos, danos na mucosa do estômago ou quadro de neutropenia. Ademais, alguns estudos mostram que *C. tropicalis* é ainda mais invasiva que *C. albicans* no intestino humano, particularmente em pacientes oncológicos. Ainda, a candidemia causada por este microrganismo é mais frequente em pacientes que apresentam neoplasias hematológicas como a leucemia (Jacobsen *et al.*, 2008). Alguns aspectos que contribuem para o aumento da incidência deste patógeno devem-se ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, ao uso prolongado de cateteres, uso de antibióticos de largo espectro, a complexibilidade no tratamento de algumas doenças e ao aumento do uso de drogas antifúngicas, tendo em vista a baixa suscetibilidade desta espécie aos antifúngicos azólicos (Kothavade *et al.*, 2010).

A espécie *Candida parapsilosis* emerge como um importante patógeno hospitalar, ocupando o segundo lugar em episódios de candidemia nos países da

América Latina, sendo que no Brasil é responsável por 15% a 30% dos casos. (Colombo *et al.*, 2006; Barbedo, Sgarbi, 2010). Este microrganismo possui alta capacidade de produzir biofilme, sendo frequentemente encontrado colonizando a mãos de profissionais da área da saúde, cateter venoso central e solução de nutrição parenteral (Levin *et al.*, 1998). A candidemia por esta espécie pode atingir até 50% dos casos em pacientes recém-nascidos pré-termo, internados em unidades de cuidados intensivos neonatais (Chapman, Faix, 2003).

Devido à divergência dos padrões de caracterização da espécie *C. parapsilosis*, esta levedura foi dividida em três grupos (I, II e III) (Roy, Meyer, 1998). Para tentar minimizar este problema de classificação Tavanti *et al.* (2005), analisaram região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do DNA ribossomal de inúmeros isolados de *C. parapsilosis* e sugeriram uma nova divisão, onde cada grupo foi classificado como uma espécie diferente. Assim, o grupo I foi classificado como pertencente à espécie *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), o grupo II foi identificado como pertencente a espécie *C. orthopsilosis* e o grupo III *C. metapsilosis* (Carvalho, 2011).

A espécie *Candida krusei* é um patógeno que pode atingir frequentemente pacientes com neoplasias hematológicas ou que se submeteram a transplantes de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (Iwen *et al.*, 1995). Ainda, alguns estudos indicam o aumento da ocorrência de candidemias causadas por esta espécie em pacientes neutropênicos, expostos a tratamento prolongado com fluconazol (Wingard, 1995; Colombo *et al.*, 2012).

As infecções por *Candida guilliermondii* são pouco frequentes, havendo alguns relatos do envolvimento desta levedura em candidemias, especialmente em pacientes com câncer (Girmenia *et al.*, 2006). Outra característica atribuída a esta levedura é sua baixa suscetibilidade a antifúngicos como a anfotericina B, triazóis e equinocandinas (Colombo *et al.*, 2012).

A espécie *Candida lusitanae* é uma levedura raramente envolvida em patologias em humanos. Alguns casos, contudo, têm sido relatados tendo esta espécie presente como agente patógeno envolvido em infecções invasivas, particularmente em pacientes imunocomprometidos, com câncer ou que realizaram transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (Pfaller, Diekema, 2007; Heeres *et al.*, 2010).

Por fim, *Candida dubliniensis* é uma espécie que possui características morfológicas e bioquímicas muito semelhantes à levedura *C. albicans*, sendo necessária a aplicação de testes moleculares para que seja possível fazer a diferenciação das espécies. Apesar das semelhanças entre as duas espécies, *C. dubliniensis* está menos frequentemente associada a infecções em humanos e apresenta um menor potencial de virulência em comparação com a espécie *C. albicans* (Schubert *et al.*, 2008).

3.5 Características morfológicas de leveduras do gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* apresentam uma morfologia microscópica caracterizada por células que variam entre as formas elíptica, alongada ou oval, podendo apresentar diferentes tamanhos. A caracterização morfológica da maioria das espécies deste gênero é baseada na visualização de microestruturas como os blastoconídeos, hifas, pseudo-hifas e clamidósporos, estruturas estas presentes na espécie *Candida albicans*. Por outro lado, outras espécies não possuem a capacidade de produzir tais estruturas, como *C. parapsilosis*, que produz apenas blastoconídeos e pseudo-hifas e *C. lusitaniae* que produz somente pseudo-hifas. A espécie *C. tropicalis*, por sua vez, produz somente blastoconídeos. Já na espécie *C. glabrata* não são encontradas estruturas como hifa ou pseudo-hifas (Bennett, 2009).

Outro aspecto morfológico que pode auxiliar na diferenciação das espécies de leveduras deste gênero é a morfologia macroscópica das colônias cultivadas em meio Sabouraud, no qual as colônias podem apresentar uma coloração que varia entre as cores branca e creme, com aspecto liso e brilhante, característico das espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae* e, granuloso ou enrugado, como nas espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Silva, 2013).

Apesar da existência de variações morfológicas entre as espécies que compõem o gênero *Candida*, como a aparência, coloração das colônias, dimensão da célula e distintas micromorfologias, não é uma tarefa fácil, mesmo para um experiente micologista, fazer a identificação precisa das leveduras com base apenas nestas características. Para a correta identificação, é necessária a utilização dos métodos convencionais baseados nas características morfológicas e bioquímicas das leveduras. Contudo, devido ao aumento da frequência de infecções fúngicas nos últimos anos, fez-se necessário aprimorar as metodologias de identificação, razão

pela qual foram desenvolvidas as técnicas moleculares, que possibilitam uma identificação mais rápida e precisa das leveduras do gênero *Candida* (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008).

3.6 Fatores de virulência

As leveduras do gênero *Candida* compõem um grupo de fungos que apresentam um diversificado mecanismo de virulência, qualificando estas leveduras como os principais agentes etiológicos de infecções fúngica em humanos. Entre estes fatores de virulência pode-se destacar a capacidade de adesão aos diferentes tecidos, a capacidade de produzir dimorfismo (que auxilia na invasão tecidual), a termotolerância e o eficiente maquinário enzimático, destacando-se as proteases e fosfolipases (Hiller *et al.*, 2011).

Os diversos fatores de virulência destes fungos não estão distribuídos de forma homogênea entre as espécies, mas um dos mais frequentes é a capacidade de produzir biofilme. O biofilme é formado por polímeros extracelulares que possuem a capacidade de aderir a diferentes tipos de superfície, como cateteres, próteses, entre outros. Ainda, o biofilme exerce um papel importante no mecanismo de resistência do fungo, pois representa um obstáculo para a ação do medicamento, devido a dificuldade de penetração do antifúngico através da matriz de exopolímeros que envolve o biofilme (D'Enfert, 2006; Bizerra *et al.*, 2008).

A produção de proteases e fosfolipases, juntamente com a capacidade de produzir biofilme, caracteriza-se como um dos principais fatores de virulência das leveduras do gênero *Candida*. Estas enzimas extracelulares exercem uma função extremamente importante no mecanismo patogênico das leveduras, pois são uma excelente ferramenta utilizada pela levedura para auxiliar no processo de degradação e invasão dos tecidos colonizados (Gokce *et al.*, 2007).

Outro aspecto que colabora com o mecanismo de patogenicidade das leveduras *Candida* spp. é sua capacidade de transformação da célula de levedura para hifas, característica peculiar de algumas espécies como *Candida albicans*, denominada dimorfismo. Tal evento celular pode auxiliar a levedura no processo de invasão tecidual (Ribeiro *et al.*, 2004).

O principal componente que auxilia as leveduras a se fixarem nos tecidos é a presença de adesinas, glicoproteínas localizadas na superfície da parede celular do

fungo que, além de exercer a função de fixação, também exercem papel importante no processo de conjugação, o que acarreta a transferência de materiais genéticos entre diferentes células. As adesinas ainda exercem influência na alteração da morfologia das colônias e no desenvolvimento do biofilme (Treagan, 2008).

A literatura cita que a maioria das espécies do gênero *Candida* possui a capacidade de induzir alteração fenotípicas (*switching*) de forma espontânea e reversível. O processo denominado *switching* produz diversas mudanças fenotípicas na levedura, como a alteração da expressão de algumas proteínas antigênicas da superfície da célula fúngica, a variação da afinidade da levedura aos tecidos do hospedeiro e, ainda, a alteração da produção enzimática e do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos (Lan *et al.*, 2002; Soll, 2004; Ferreira, 2008).

3.7 Diversidade genética entre espécie de *Candida* spp

As leveduras *Candida* spp. são constituídas por um grande número de microrganismos que possuem diferentes características morfológicas e bioquímicas. O genoma das espécies que compõem este grupo apresenta uma grande variabilidade, mesmo assim, tais leveduras são classificadas em um mesmo gênero (Bennett, 2009; Colombo *et al.*, 2012).

A variabilidade genética entre as leveduras deste gênero é grande, pois espécies como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* possuem um genoma diplóide, enquanto que espécies como *Candida glabrata* são haplóides. Outro aspecto que demonstra esta variabilidade pode ser observado no número de cromossomos, que na espécie *C. glabrata* possui número de treze cromossomos que codificam 5283 genes enquanto que a espécie *Candida albicans* possui um genoma diploide, com 8 pares de cromossomos homólogos, com tamanho variando entre 1 a 4 Megabase, totalizando aproximadamente 14,3 (Mb) (Bougnoux *et al.*, 2006; Odds, Jacobsen, 2008; Butler *et al.*, 2009).

O DNA ribossômico (rDNA) de *Candida* é haploide, sendo constituído de um número de cópias que variam de 50 a 100, possuindo a conformação de arranjo *in tandem* (Odds *et al.*, 2004). Existem três regiões codificadoras no DNA ribossômico, altamente conservadas, as quais são denominadas de 5.8S e constituídas por 160 pares de bases, 18S com 1800 pares de bases e a região 28S formada por 3400 pares de bases. No rDNA existem fragmentos extremamente variáveis que

flanqueiam a região 5.8S denominados de *internal transcribed spacer regions* (ITS). Sua função não é exatamente conhecida, mas sabe-se que sua remoção em etapas que antecedem o evento da transcrição, provocam deleções no RNA maduro (Iwen *et al.*, 2002; Carvalho, 2011).

As leveduras do gênero *Candida* não possuem estruturas reprodutivas sexuais, reproduzindo-se predominantemente de forma clonal. Espécies diplóides, porém, como *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, podem ocasionalmente sofrer recombinação e apresentar considerável grau de heteroziguidade (Tavanti *et al.*, 2004; Selmecki *et al.*, 2006). Ainda, outros eventos contribuem com a variabilidade genética entre as espécies, como a perda parcial ou total de cromossomos, substituição, microvariação ou microevolução. Tais eventos têm sido observados em diversos estudos filogenéticos que analisam isolados destas leveduras (Wu *et al.*, 2005; Odds *et al.*, 2006).

3.8 Epidemiologia das leveduras *Candida* spp.

As leveduras do gênero *Candida* tornam-se patogênicas quando ocorrem alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Tais alterações, por sua vez, por sua vez, podem ocorrer devido a procedimentos médicos invasivos, prematuridade, envelhecimento associado a doenças degenerativas, neoplasias, imunodeficiência congênita ou adquirida e imunossupressão induzida por drogas, entre outros fatores (Dignani *et al.*, 2003).

As leveduras do gênero *Candida* são os fungos predominantes da microbiota autóctone da cavidade oral e trato gastrointestinal. A frequência da colonização desta levedura na cavidade bucal pode variar em indivíduos normais. A maioria dos autores, porém, relatam taxas que oscilam entre 20% a 40% da população (Vanden Abbeele *et al.*, 2008).

Espécie de *Candida* spp têm sido isoladas no trato gastrointestinal em 20% a 80% de pacientes adultos saudáveis. Cerca de 20% a 30% das mulheres apresentam colonização por estas leveduras na cavidade vaginal. Entre as 20 espécies de *Candida* spp. de interesse clínico para humanos, *C. albicans* é a que apresenta maior frequência de isolamento nos diferentes sítios anatômicos, podendo chegar a 90% dos isolados da cavidade bucal (Colombo, Guimarães, 2003).

Leveduras do gênero *Candida* são os agentes etiológicos envolvidos em 80% das infecções hospitalares de origem fúngicas, sendo o quarto microrganismo mais frequentemente identificado como causador de infecção na corrente sanguínea. (Asmundsdottir *et al.*, 2008). Mais de 90% dos casos de infecções fúngicas invasivas são causados pelas espécies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pfaller, Diekema, 2007; Warnock, 2007).

Nos Estados Unidos as espécies de leveduras *Candida* são a quarta causa mais comum de infecções hospitalares na corrente sanguínea e a principal causa de infecção fúngica sistêmica, na qual *Candida albicans* é a principal espécie (Pfaller, Diekema, 2007; Karthaus, Cornely, 2007).

A incidência de candidemias em pacientes internados em hospitais públicos no Brasil é de 2,5 casos por 1000 internações, taxa considerada até 10 vezes maior que aquelas registradas em hospitais europeus e norte americano. Este dado mostra-se semelhante aos encontrados em outros países da América do Sul (Diekema *et al.*, 2002; Colombo *et al.*, 2006).

3.9 Formas clínicas da Candidíase

As infecções provocadas por este grupo de fungos são muito diversificadas, podendo ser classificadas clinicamente em superficial e sistêmica. As infecções superficiais acometem pele e anexos ou a mucosa oral, esôfago, vaginal ou urinária. As sistêmicas atingem a corrente sanguínea ou órgãos internos (Lacaz *et al.*, 2002; Colombo *et al.*, 2012).

A candidíase superficial cutânea acomete áreas intertriginosas da pele das mãos, pés, virilhas, axilas ou anexos (unhas). Esta forma de candidíase não está relacionada a alterações imunológicas do hospedeiro e sim a condições específicas, como a presença de umidade devido à oclusão ou maceração excessiva da pele, sendo que esta situação está intimamente relacionada à atividade ocupacional. Neste tipo de infecção a espécie *Candida albicans* é um dos agentes mais comumente isolados (Lacaz *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2007).

A candidíase oral afeta pessoas com alteração da resposta imunológica, ocorrendo principalmente em recém-nascidos prematuros ou idosos, podendo acometer também usuários de próteses ou pacientes com exposição a fármacos imunossupressores (quimioterápicos, corticosteróides), antibióticos, portadores de

doenças como câncer, diabetes, sarcoidose, cirrose, desnutrição, xerostomia e AIDS. Entre os agentes mais frequentemente envolvidos em episódios de candidíase orofaríngea destaca-se a espécie *Candida albicans* (Vazquez, 2003; Weerasuriya, Snape, 2006).

A candidíase esofágica é classificada como uma forma semi-invasiva da candidíase, ocorrendo principalmente em pacientes com AIDS, podendo atingir também indivíduos com câncer ou que estejam fazendo uso de medicamentos como corticosteróides, antibióticos, antagonistas dos receptores H2 ou inibidores da bomba de prótons. Ainda, esta patologia pode ser observada em pacientes desnutridos, diabéticos, que sofram de alcoolismo ou que tenham histórico de doença esofágica progressiva (Vazquez, Sobel, 2002; Golub, Johns, 2005).

A candidíase vulvovaginal é uma patologia que acomete cerca de 75% das mulheres durante a vida reprodutiva, sendo que os principais fatores predisponentes ao desenvolvimento desta forma de candidíase incluem a exposição a altos níveis de estrogênios (anticoncepcionais ou reposição hormonal), diabetes *mellitus*, o uso de antibióticos e hábitos inadequados de higiene. Entre os agentes mais frequentemente envolvidos nesta patologia destaca-se a espécie *Candida albicans* seguida de *C. glabrata* (Giraldo, Witkin, 1998; Galle, Gianinni, 2004; Holanda *et al.*, 2005).

A candidíase urinária, ou candidúria, é uma situação patológica que ocorre com frequência em pacientes hospitalizados, principalmente aqueles internados em unidade de terapia intensiva, que apresentam fatores de risco como idade avançada, pertencentes ao gênero feminino, sob utilização de drogas imunossupressoras como corticosteróides, uso de antibióticos de amplo espectro, com presença de anormalidade no trato urinário, diabéticos, utilizando cateterismo vesical de demora e que se encontram em pós-operatório decorrente de cirurgia de grande porte. Os principais agentes envolvidos em candidúria são *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Nucci, 2000; Kauffman, 2005; Sobel *et al.*, 2011).

A candidíase no trato respiratório não é um evento relativamente comum, mas pacientes neutropênicos que realizaram transplante de pulmão ou em tratamento para doenças hematológicas malignas, podem desenvolver esta patologia como consequência da complicação de uma candidemia (Nunley *et al.*, 2002; Azoulay *et al.*, 2004).

A peritonite fúngica é uma forma invasiva da candidíase, podendo ser decorrente da diálise peritoneal ou complicações pós-operatórias. Em ambas as situações existe um alto índice de mortalidade. Na diálise peritoneal, a peritonite ocorre principalmente em pacientes diabéticos. Na candidíase peritoneal pós-operatória a maioria dos casos são relacionados a episódios secundários de uma peritonite bacteriana primária. As espécies *C.albicans*, *C. parapsilosis* e *Candida tropicalis* são os principais agentes envolvidos (Sandven *et al.*, 2002; Bibashi *et al.*, 2003; Prasad, Gupta, 2005; Souza *et al.*, 2007).

A candidíase hematogênica, ou candidemias, em sua maioria possui origem endógena, sendo decorrente da translocação do patógeno do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea. Por isto, toda situação que provoca um aumento da colonização intestinal desta levedura representa um risco ao desenvolvimento de candidemia. Assim, pacientes sob o uso de antibióticos ou corticosteróides, com obstrução intestinal, jejum prolongado, nutrição parenteral, hipotensão, mucosite secundária ou ainda, que se submeteram a procedimentos cirúrgicos, quimioterápicos ou radioterápicos, são mais suscetíveis ao desenvolvimento de colonização do trato gastrointestinal por *Candida* spp. Ainda, fatores exógenos podem contribuir com a candidemia, como procedimentos clínicos invasivos, utilização de próteses, cateter venoso central e contaminação de solução de infusão (Alexander *et al.*, 1990; Pfaller, 1996). Diferentes estudos apontam que no Brasil as espécies com maior prevalência são *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Colombo *et al.*, 2003; Nucci *et al.*, 2010).

A candidíase disseminada é uma complicação da candidemia. Esta situação patológica consiste na difusão de *Candida* spp da corrente sanguínea para um ou mais órgãos, no qual os principais sítios atingidos são o fígado, baço, rins, olhos e coração. Entre as principais complicações incluem-se a pielonefrite, endocardite, envolvimento osteoarticular, oftálmico e infecção no sistema nervoso central. As condições predisponentes para a candidíase disseminada são neutropenia severa e complicações pós-cirurgias, tendo como principais espécies envolvidas *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (Pfaller, Diekema, 2007; Karthaus, Cornely, 2007).

3.10 Tratamento

Os principais fatores que contribuem para as altas taxas de mortalidade associadas às infecções fúngicas são o diagnóstico lento e a dificuldade na escolha do tratamento farmacológico. Tais fatores são atribuídos à inespecificidade dos sintomas das infecções fúngicas, particularmente no início do processo infeccioso e pelo fato dos métodos de diagnósticos serem demorados e de difícil execução. Somando-se a estas dificuldades, acrescenta-se a constante variação do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos. Em resumo, a associação destes fatores torna difícil a tarefa do clínico no momento da elaboração da conduta terapêutica (Cannon *et al.*, 1995).

Em função disto, houve uma mudança expressiva nas opções terapêuticas para tratamento de infecções fúngicas na última década. Anteriormente, as escolhas restringiam-se aos poliênicos, aos imidazólicos e aos triazólicos de primeira geração, como o fluconazol. Atualmente existem cinco classes de drogas antimicóticas que possuem diferente espectro e mecanismos de ação. Fazem parte destas classes os poliênicos, azóis, alilaminas, fluoropirimidinas e as equinocandinas (Kouidhi *et al.*, 2010; Colombo *et al.*, 2012).

Entre as opções disponíveis para o tratamento de candidíase invasiva estão a administração de derivados azólicos, a anfotericina B ou equinocandina. Já para o tratamento de infecções mucocutâneas, há preferência pelos antifúngicos azóis, devido à baixa toxicidade e maior eficácia, além de possibilitarem a formulação de diferentes preparações para uso tópico e oral (Pappas *et al.*, 2004; Znaidi *et al.*, 2009).

3.11 O fenômeno da resistência aos antifúngicos entre leveduras do gênero *Candida*

A infecção fúngica é uma das principais causas de mortalidade em pacientes imunodeprimidos (Hung *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). Este fato faz com que a escolha da droga antifúngica mais adequada para o tratamento da infecção seja uma tarefa árdua, pois além do crescente número de casos, tem-se verificado uma perda e suscetibilidade a drogas antifúngicas, originando o fenômeno denominado de resistência a múltiplas drogas (MDR) (Kouidhi *et al.*, 2010).

O fenômeno da resistência a múltiplas drogas (MDR) é bem estudado em células cancerígenas, que apresentam resistência a vários quimioterápicos, ou entre as bactérias resistentes aos antibióticos. Entre os fungos, contudo, faz-se necessário incrementar os estudos dos mecanismos genéticos e bioquímicos responsáveis pela resistência, para permitir uma compreensão melhor dos fatores que levam à seleção de linhagens MDR (Grkovic *et al.*, 2002; Morschhäuser, 2010).

A maioria dos mecanismos de resistência a drogas antifúngicas ocorre pelo efeito de mutações genéticas. Tais mutações podem provocar alterações no sítio catalítico de enzimas que são alvo de drogas antifúngicas ou, em fatores de transcrição, responsáveis pela regulação da expressão de genes envolvidos nos mecanismos de resistência (Cannon *et al.*, 2009).

As infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida*, são comumente tratadas com antifúngicos azólicos e dentre estes, principalmente, o fluconazol (Pinjon *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2008). Entretanto, a resistência a agentes antifúngicos, como a que acontece com o fluconazol, pode ter diferentes origens. Algumas espécies, como *Candida albicans*, após longo período de exposição ao antifúngico, podem estimular a superexpressão de genes como *CDR1* e *CDR2*, os quais ativam mecanismos de resistência à droga, já em espécies como *Candida krusei*, a resistência é intrínseca a este antifúngico (Orozco *et al.*, 1998; Cannon *et al.*, 2007).

Diversos mecanismos moleculares são descritos como ferramentas utilizadas por estas leveduras no desenvolvimento de resistência frente a drogas antifúngicas. Podem-se citar alterações conformacionais de enzimas que são alvo das drogas antifúngicas, a ativação de mecanismos que degradam ou reduzem a concentração de fármacos no citoplasma da célula ou, ainda, alterações cromossômicas que acarretam mudança transcricionais de proteínas. Contudo, outros mecanismos, ainda desconhecidos, podem estar envolvidos na resistência de leveduras *Candida* a diferentes drogas antifúngicas (Manoharlal, 2008; Marie, White, 2009).

3.12 Classes de drogas antifúngicas

Apesar da constante pesquisa pelo desenvolvimento de novas drogas que possuam eficácia no tratamento das infecções fúngicas, os resultados são relativamente limitados. Atualmente, dentro da micologia médica, o tratamento

contra infecções fúngicas se restringe a poucas classes de drogas, sendo estas classes compostas pelos poliênicos, alilaminas, fluoropirimidinas, equinocandinas e os azóis (Kouidhi *et al.*, 2010; Colombo *et al.*, 2012).

Os poliênicos são moléculas orgânicas cíclicas anfotéricas, que agem formando poros na membrana plasmática da célula fúngica, os quais perturbam a integridade da membrana, levando ao efluxo de cátions, resultando na morte celular. Os membros mais importantes desta classe são a Anfotericina B e a Nistatina (Loeffler, Stevens, 2003; Lemke, *et al.*, 2005).

As alilaminas são aminas insaturadas, que tem na terbinafina o principal componente do grupo. Esta classe de antifúngico possui ação fungistática e age inibindo a biossíntese do ergosterol, acarretando na instabilidade da membrana da célula fúngica. Sua maior aplicação está relacionada ao tratamento de micoses cutâneas (Cannon, *et al.*, 1995; Odds, *et al.*, 2003).

As fluoropirimidinas são análogos estruturais dos nucleotídeos, que agem provocando a formação de RNA aberrante ou inibindo a síntese do DNA. Os únicos representantes utilizados para tratamento contra as infecções fúngicas em humanos são a 5-fluorocitosina (5-FC) e 5-fluorouracil (5-FU) (Kouidhi, *et al.*, 2010).

As equinocandinas são lipopeptídeos e fazem parte desta classe a caspofungina, anidulafungina e micafungina. Este grupo de drogas possui ação fungicida e seu principal alvo consiste na inibição da síntese dos glicanos, importante componente da parede da célula fúngica (Kouidhi, *et al.*, 2010).

Os azóis formam a classe mais comum de antifúngicos com ação fungistática e são divididos em imidazóis, dos quais fazem parte o cetoconazol, miconazol e clotrimazol e os triazóis, onde os principais componentes do grupo são o fluconazol, itraconazol e variconazol (Florent, *et al.*, 2009; Morschhäuser, 2010).

Os antifúngicos azólicos atuam na biossíntese do ergosterol, principal componente das membranas fúngicas, através da inibição da enzima lanosterol 14 α -demetilase (*Erg11p*), pertencente à superfamília citocromos P-450. A inibição da *Erg11p* pelo fluconazol não resulta somente na redução do ergosterol, mas também no acúmulo de lanosterol, o qual é convertido em 14 α -metilfecosterol pela ação da *Erg3p* e, subsequentemente, em 14 α -metilergosta-8,24(28)-dien-3,6diol, composto tóxico que inibe o crescimento celular (Akins, 2005; Manastir, *et al.*, 2009). Em nível molecular, o fluconazol provoca a inibição enzimática através da ligação do seu nitrogênio livre ao grupo funcional heme da enzima lanosterol 14 α -demetilase

(*Erg11p* ou 14DM), o que acarreta inibição da demetilação do lanosterol e, conseqüente suspensão da síntese (Znaidi, *et al.*, 2009; Morschhäuser, 2010).

3.13 Padrão de suscetibilidade de *Candida* às diferentes classes de antifúngicos

Existe uma grande variação no nível de resistência entre as diferentes classes de drogas antigênicas. A resistência aos polienos e equinocandinas não é frequente, enquanto que aos fluoropirimidinas (5-FC), imidazóis e triazóis é relativamente mais comum (Loeffler, Stevens, 2003).

Algumas características influenciam na resposta do microrganismo frente à droga antifúngica, entre estas, podem-se destacar o tipo de fungo, a concentração da dose do medicamento, o tempo de duração do efeito farmacológico e do mecanismo de ação das drogas (Sanglard *et al.*, 2003).

Entre as espécies de leveduras do gênero *Candida*, *C. albicans* é a espécie mais frequentemente envolvida em infecções superficiais e invasivas, nos diferentes sítios anatômicos do corpo humano. A espécie *C. albicans* é naturalmente sensível aos antifúngicos sistêmicos, casualmente resistente aos polienos como a anfoteromicina B e, poucos são os relatos de resistência às equinocandinas. A resistência ao azólicos, por sua vez, está geralmente associada à exposição prolongada a estes fármacos (Sanglard, Odds, 2002; Ben-Ami *et al.*, 2011).

A espécie *Candida dubliniensis* apesar de possuir características morfológicas e bioquímicas muito semelhante à espécie *C. albicans*, apresenta um menor potencial patogênico, mas possui alta probabilidade de adquirir resistência aos antifúngicos azólicos (Krcmery, Barnes, 2002).

Candida tropicalis é outra espécie importante pela sua frequência de isolamento em casos clínicos. Os isolados desta espécie apresentam sensibilidade à anfoteromicina B e à maioria dos antifúngicos azólicos. Há relatos, porém, de resistência ao fluconazol. Entretanto *C. tropicalis* apresenta resistência intrínseca a fluoropirimidinas (5-FC) (Kouidhi *et al.*, 2010; Alp *et al.*, 2010).

Embora com uma incidência menor na etiologia de infecções, *Candida glabrata* apresenta singular importância por possuir sensibilidade reduzida aos antifúngicos azólicos, particularmente ao fluconazol. Em isolados clínicos resistentes a esta droga pode-se observar resistência cruzada a outros azólicos como

itraconazol, cetoconazol e variconazol (Sanguinetti *et al.*, 2005). Ainda, isolados desta espécie apresentam *in vitro* sensibilidade reduzida a anfotericina B (Pfaller *et al.*, 2004).

As leveduras que compõem o complexo *Candida parapsilosis*, de um modo geral, apresentam suscetibilidade à maioria dos agentes antifúngicos, dentre eles as anfoteromicina B e os derivados azólicos (Carvalho, 2011). Porém, em estudos clínicos realizados por Van Asbeck *et al.* (2008), os quais avaliaram o perfil de suscetibilidade das três espécies que compõem o complexo, verificou-se sensibilidade reduzida de *C. parapsilosis sensu strictu* para equinocandinas (caspofungina e anidulafungina) e de *C. metapsilosis* para o fluconazol. Tais dados sugerem existir diferenças no padrão de sensibilidade aos antifúngicos entre as espécies que compõem este complexo.

Outras leveduras bem menos frequentes, como a espécie *Candida krusei*, são intrinsecamente resistentes ao fluconazol, sendo na maioria dos casos sensíveis ao variconazol (Cannon *et al.*, 2007). Já isolados clínicos de *Candida guilliermondii*, apresentaram *in vitro*, resistência à anfotericina B, triazóis e equinocandinas (Hazen, 1995). Ainda, a espécie *C. lusitanea* possui alta sensibilidade aos antifúngicos triazólicos e consideráveis níveis de resistência a anfoteromicina B (Colombo *et al.*, 2012).

3.14 Mecanismos moleculares de resistência das leveduras *Candida* aos antifúngicos

Diversos mecanismos moleculares são utilizados pelas leveduras *Candida* para produzir resistência às drogas antifúngicas e, particularmente, à classe dos azóis. Entre estes mecanismos encontram-se as bombas de efluxo, as alterações na biossíntese do ergosterol e as alterações mutacionais e de expressão do gene *ERG11* (White *et al.*, 2002; Chau *et al.*, 2004) (Figura 1).

A superexpressão de bombas de efluxo leva à diminuição da concentração da droga antifúngica intracelular, fazendo com que o antifúngico não apresente concentração suficiente dentro da célula para desenvolver sua ação fungistática ou letal. Este mecanismo é identificado em algumas espécies de fungos como *Candida albicans*, que ocorre frente aos antifúngicos azóis como o fluconazol (Vogel *et al.*, 2008).

O mecanismo de efluxo de drogas, que resulta no fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR), é formado por duas famílias de proteínas. A primeira, e mais importante, identificada como os transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), codificadas por seis genes. Contudo, apenas os genes *CDR1/CDR2* estão envolvidos na resistência a drogas (Sanglard, Odds, 2002; Akins, 2005). A segunda família de proteínas é composta pelo transportador de membrana do tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*), as quais são codificadas pelo gene *MDR1* (Wirsching *et al.*, 2000; Manoharlal *et al.*, 2010).

Alguns genes são apontados com participantes do fenótipo de multidroga resistente (MDR) entre o fungo patogênico *Candida*, destacando-se o gene *CDR1*, *CDR2*, *PDR16* (Coste *et al.*, 2007; Znaidi *et al.*, 2007), *MDR1*, *RTA2*, *FLU1* (Calabrese *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2008), *ERG11* (Dunkel *et al.*, 2008) e *ERG3* (Loeffler, Stevens, 2003), possuam particular importância no desenvolvimento de resistência frente aos antifúngicos, particularmente entre a classe dos azólicos (Znaidi *et al.*, 2009).

Os genes *CDR1* e *CDR2* são responsáveis pela codificação de proteínas que fazem parte das bombas de efluxo do transportador ABC (*ATP-binding cassette*). A superexpressão destes genes tem sido frequentemente observada em isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes aos antifúngicos azóis (Prasad *et al.*, 2006).

O gene *MDR1* faz parte de um conjunto de genes responsáveis pela codificação de proteínas que compõem a segunda bomba de efluxo mais importante das leveduras *Candida albicans*, denominada de transportador de membrana do tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Estes transportadores de membrana estão envolvidos no fenótipo de resistência a múltiplas drogas (Sá-Correia *et al.*, 2009). Além da espécie *C. albicans*, outros fungos apresentam este mecanismo, como *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus fumigatus* (Pasrija *et al.*, 2007).

Tem sido observado que a superexpressão do gene *FLU1* e *RTA2* isoladamente não gera resistência a fluconazol. Todavia, quando estes genes são ativados em conjunto com outros genes, como o *PDR16*, *MDR1* e *CAP1*, o fenótipo de resistência aos antifúngicos azólicos é observado em isolados de *Candida albicans*, sugerindo que estes genes formam um complexo de ativação das bombas de efluxo (Calabrese *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2008).

3.15 Gene *ERG11*

Os genes *ERG11* e *ERG3* são genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese do ergosterol. Alterações nestes genes desencadeiam um importante mecanismo de resistência aos antifúngicos azólicos em espécies de leveduras do gênero *Candida*. Mutações em pontos específicos no gene *ERG11* e gene *ERG3* provocariam perda da capacidade dos antifúngicos azóis em bloquear a síntese do ergosterol e, com isto, aumentariam a tolerância destas leveduras a este grupo de antifúngicos (Akins, 2005; Yan *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008).

O ergosterol é um composto fundamental para que a célula fúngica possa manter a integridade e as funções da membrana plasmática. Os antifúngicos azólicos agem inibindo a biossíntese deste esterol, através da inativação da enzima 14 α -demetilase, de modo que isto resulta na diminuição do ergosterol disponível para as membranas e no acúmulo de metabólitos intermediários (Loeffler, Stevens, 2003; Manastir *et al.*, 2009). Um destes compostos intermediários é o 14 α -metilfecosterol, alvo da enzima Δ 5,6-desaturase, a qual transforma este esterol em uma substância tóxica (14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3,6diol) para a célula que, juntamente com a falta de ergosterol, resulta na parada do crescimento celular. Contudo, quando o gene *ERG3* responsável pela codificação da enzima Δ 5,6-desaturase sofre mutação, ocorre a não produção de metabólitos tóxicos na célula. Desta forma, as leveduras que sofrem alterações nesta enzima, desenvolvem resistência à ação dos antifúngicos azóis (Kelly *et al.*, 1995; Akins, 2005).

Outra característica que tem sido difundida como um importante mecanismo de resistência das leveduras *Candida* frente aos antifúngicos azóis, é a alteração na atividade da lanosterol 14 α -demetilase (*Erg11p* ou 14DM), enzima esta codificada pelo gene *ERG11* (Du *et al.*, 2004; Morschhäuser, 2010). Os antifúngicos azóis inibem a atividade desta enzima, a qual participa da biossíntese do ergosterol. Mutações no gene *ERG11* podem induzir a mudanças em sequências de aminoácidos, acarretando em alterações na estrutura tridimensional da enzima. Estas mudanças conformacionais da proteína podem induzir a perda de afinidade do antifúngico azólico ao sítio de ligação da enzima e, com isto, levar à resistência aos azóis (Sanglard *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2009).

Alterações na atividade da enzima lanosterol 14 α -demetilase também podem ocorrer pelo aumento da expressão do gene *ERG11*, o que resulta em aumento da

concentração da enzima no espaço intracelular. Este fato exige a necessidade de uma maior concentração do antifúngico para provocar a inibição da atividade enzimática. Tal mecanismo molecular encontrado em diversos isolados de *Candida albicans*, individualmente não é capaz de induzir a resistência ao fluconazol, entretanto, quando associado a outros mecanismos, como o aumento da expressão de genes que codificam as bombas de efluxo, pode estar envolvido na resistência de leveduras *Candida* spp aos antifúngicos azólicos (Perea *et al.*, 2001; Goldman *et al.*, 2004).

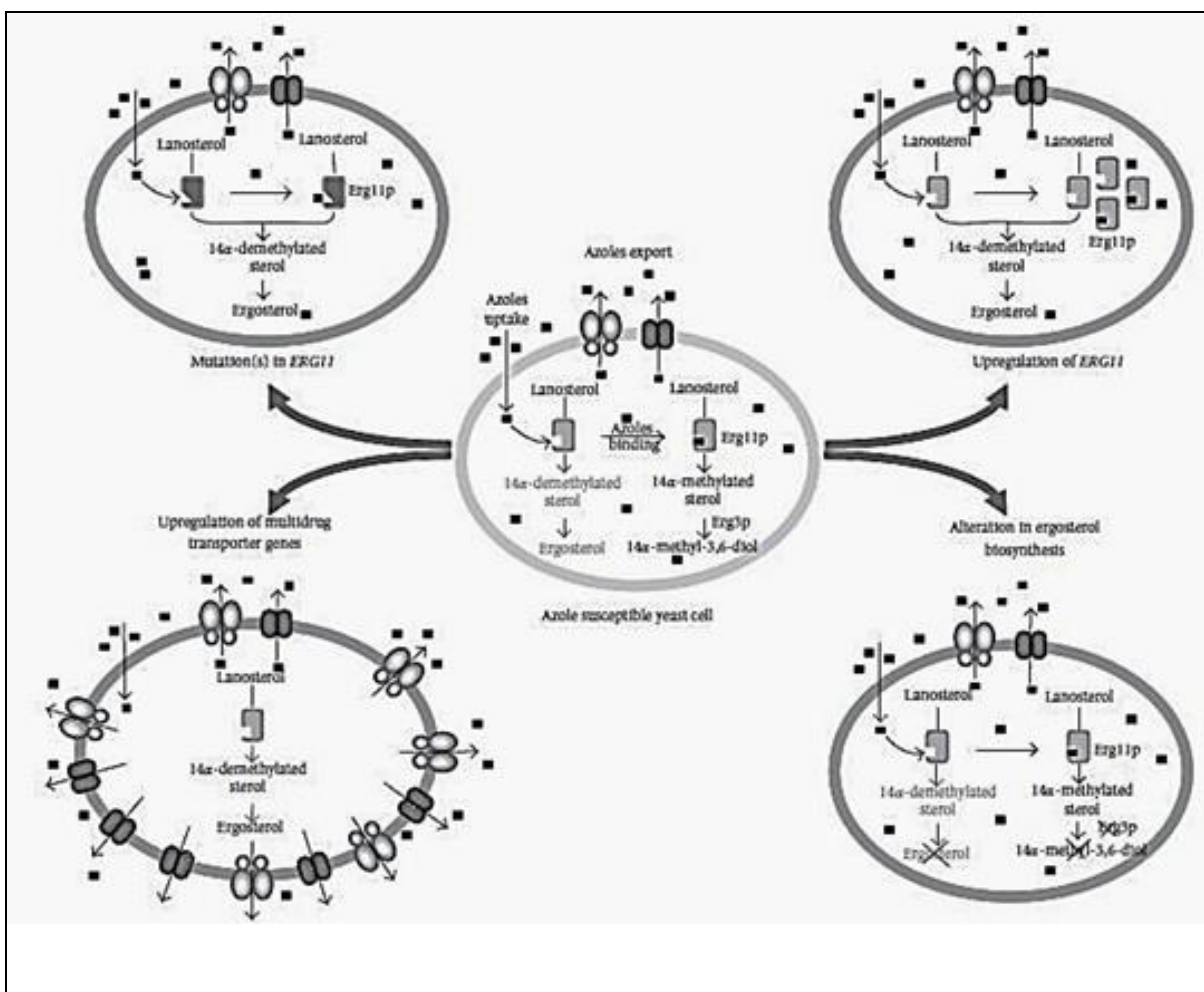


Figura 1: Os mecanismos de resistência a antifúngicos azóis presentes em *Candida albicans* (Vandeputte *et al.*, 2012).

3.16 Métodos moleculares de identificação das leveduras do gênero *Candida*

O diagnóstico laboratorial micológico é de extrema importância para auxiliar o clínico na elaboração de medidas de prevenção, controle e tratamento da infecção por *Candida* spp. Ou seja, o isolamento e a identificação da espécie de levedura envolvida no processo infeccioso é uma valiosa informação para a escolha da conduta terapêutica a ser aplicada ao paciente (Colombo *et al.*, 2012).

As técnicas laboratoriais de diagnóstico micológico consistem na visualização de elementos fúngicos nos diferentes líquidos ou tecidos, utilizando metodologias como o exame micológico direto, coloração de gram e biópsias ou por cultura dos diferentes materiais biológicos. Para a identificação da espécie de *Candida* spp. utilizam-se métodos convencionais, baseados nas características morfológicas e bioquímicas das leveduras, ou através de testes moleculares, que por sua vez possibilitam um resultado com maior precisão e rapidez, na detecção e identificação de leveduras do gênero *Candida* (Ciardo *et al.*, 2006; Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008).

Testes moleculares para identificação de microrganismos, entre os quais se incluem as leveduras do gênero *Candida*, não são utilizados rotineiramente em laboratórios clínicos. Esta metodologia de identificação é útil em estudos epidemiológicos, revisão taxonômica de algumas espécies e em pesquisas. Contudo, na constante evolução da medicina, é necessário que os diagnósticos das patologias sejam cada vez mais exatos e precisos. Por esta razão, a aplicação de testes moleculares para identificação correta do agente etiológico de uma determinada doença é extremamente importante para a elaboração da conduta terapêutica (Moreira-Oliveira *et al.*, 2005; Tavanti *et al.*, 2005).

Atualmente existe um grande número de metodologias moleculares que possibilitam a identificação precisa de um microrganismo, como a reação de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), quando utiliza *primers* específicos para uma espécie, a reação de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), o *fingerprinting* de regiões mini e microssatélite (MS-PCR), o *Multilocus sequence typing*, *Panfungal loop-mediated Isothermal DNA* (LAMP) e, ainda, a metodologia que utiliza o sequenciamento de regiões específicas do genoma do microrganismo, entre outras técnicas (Odds, 2008; Inácio *et al.*, 2008; Zalar *et al.*, 2011).

Para a identificação de espécies do gênero *Candida* utilizando técnicas moleculares, distintas regiões do genoma destas leveduras são sugeridas como

adequadas para a amplificação. Muitos genes presentes no genoma destes microrganismos têm se mostrado úteis para serem utilizados em estudos filogenéticos. Um exemplo desta ampla variedade é a utilização do DNA Ribossomal (rDNA), que possui sequências gênicas intercaladas altamente variáveis dentro e entre populações e sequências codificadoras que são extremamente conservadas. Estas regiões podem servir como importantes marcadores em estudos filogenéticos entre populações (Reiss, Odds, 2008).

A utilização dos genes ribossômicos em estudos filogenéticos para identificação de fungos patogênicos é uma escolha cada vez mais frequente. Nestes processos taxonômicos as regiões ITS1, gene 5.8S e ITS2 do rDNA são locais preferidos, pois as sequências ITS1 e ITS2, são regiões altamente variáveis, ideais para utilização em processos taxonômicos de fungos de diferentes espécies (Einsele *et al.*, 1997; Kappe, Muller, 1998).

Entre os diferentes métodos moleculares utilizados na identificação de espécies de fungos patógenos e consequente execução da relação filogenética, elegeu-se como método de escolha o sequenciamento automatizado dos produtos amplificados pela reação do PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O sequenciamento automatizado, em comparação com outras tecnologias moleculares, permite fornecer maior nível de produtividade e precisão nos resultados, o que contribui para produzir uma análise filogenética mais qualificada (Odds, Jacobsen, 2008; Mcmanus *et al.*, 2008).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Investigar o polimorfismo no gene *ERG11* de isolados clínicos de levedura *Candida* spp e o correlacionar com o padrão de suscetibilidade ao antifúngico fluconazol.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar os aspectos epidemiológicos envolvidos na colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida*, em pacientes transplantados renais e diabéticos;
- Avaliar a diversidade genética entre isolados de *Candida albicans* deste estudo e comparar com isolados descritos na literatura;
- Identificar quais espécies de leveduras *Candida* spp colonizam os diferentes grupos de pacientes imunocomprometidos estudados nesta pesquisa;
- Determinar o perfil de suscetibilidade *in vitro* ao fluconazol, das espécies de leveduras *Candida*, utilizando técnica da difusão para determinação da concentração inibitória mínima;
- Pesquisar o polimorfismo em fragmentos do gene *ERG11* entre as espécies *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, isoladas de pacientes transplantados renais e diabéticos;
- Confrontar as mutações encontradas no gene *ERG11* destes isolados, com as citadas na literatura científica;
- Identificar possíveis novos pontos de mutação do gene *ERG11*, entre os isolados de *Candida*;
- Correlacionar as mutações no gene *ERG11* com o perfil de suscetibilidade/resistência dos isolados clínicos.

5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

5.1 Artigo 1

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Candida* OBTIDOS DE PACIENTES DIABÉTICOS E TRANSPLANTADOS RENAIIS

Volmir Pitt Benedetti¹, Chirlei Glienke²

¹ Departamento de Microbiologia da Universidade Paranaense – Francisco Beltrão – PR

² Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal do Paraná- UFPR.

RESUMO

Os principais fungos patógenos oportunistas dos seres humanos são as leveduras do gênero *Candida*, que possuem distintos mecanismos de virulência, diferentes características morfológicas, bioquímicas e uma grande variabilidade genética entre as espécies. Esta pesquisa avaliou a diversidade genética entre isolados de *Candida* spp obtidos de pacientes diabéticos e transplantados renais e comparar com isolados descritos na literatura. Foram analisadas 120 amostras de *Candida* spp isoladas de pacientes diabéticos, transplantados renais e pacientes sem déficit imunológico. Para o estudo molecular utilizou a amplificação por reação de PCR, seguido de sequenciamento de fragmentos da região ITS1, gene 5.8S, ITS2 e fragmentos do gene 28S do rDNA. Na análise filogenética observou-se a formação de 2 grupos, sendo que o grupo A é composto pelo maior número de isolados e onde se enquadram as linhagens de referência e a maioria dos isolados pertencentes a outros estudos. A baixa diversidade genética entre os isolados pode estar justificada pela proximidade geográfica dos pacientes investigados. Constatou que o polimorfismo gênico entre os isolados da espécie *C. albicans* se assemelha geneticamente a linhagens de referência e a isolados de outros estudos brasileiros.

Palavras chaves: *Candida* – Paciente imunocomprometido – DNA ribossomal

Introdução

Os principais fungos patógenos oportunistas dos seres humanos são as leveduras do gênero *Candida*, em especial a espécie *C. albicans*, levedura comensal do trato urogenital, gastrintestinal e da pele (Rodaki *et al.* 2009). Algumas espécies

fazem parte da microbiota normal do homem, sendo encontradas como saprófitas em dobras da pele, orofaringe, mucosa vaginal e trato gastrointestinal (Barbedo, Sgarbi, 2010). Este grupo de fungos comumente causa infecções superficiais, afetando pele, anexos ou mucosas. No entanto, defeitos de imunidade do hospedeiro, ferimentos físicos ou intervenções médicas podem permitir que estes agentes acessem diferentes órgãos internos e tecidos, causando infecções potencialmente fatais (Leach *et al.*, 2011; Taverna *et al.*, 2013).

As infecções fúngicas, particularmente as causadas por agentes oportunistas, atingem frequentemente pacientes submetidos a transplante de órgão, fazendo uso de drogas imunossupressoras, em tratamento contra o câncer, sob terapia intensiva, recebendo nutrição parenteral, sob efeito de antibióticos de amplo espectro, ou com AIDS (Ruhnke, 2006; Manastir *et al.*, 2009). Ainda, pacientes que podem apresentar maior suscetibilidade a infecções fúngicas oportunistas são os portadores de doenças metabólicas como a diabetes, os que realizaram esplenectomia, pacientes desnutridos, com deficiência de zinco, alcoolistas, acometidos por infecções ou infestações e, ainda sobre estresse crônico (Forte, 2004; Rodaki *et al.*, 2009).

A maioria das infecções fúngicas em humanos são causadas pelas espécies *Candida albicans* e *Candida glabrata*, com taxas de prevalência de aproximadamente 70% e 15%, respectivamente (Ruhnke, 2006; Kolaczowski *et al.*, 2009). Contudo, infecções causadas por outras espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA), como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica* e *C. norvegensis* têm se mostrado cada vez mais frequentes, sendo em algumas situações predominantes (Ng *et al.*, 1998; Kothavade *et al.*, 2010).

As leveduras do gênero *Candida* compõem um grupo de aproximadamente 200 espécies, das quais apenas 20 são descritas como possíveis agentes etiológicos de candidíases (Sugita, Nishikawa, 2004). Entretanto, *C. albicans* é a espécie mais importante e mais estudada, a mais frequentemente envolvida em infecções fúngicas, sendo o principal agente etiológico da candidíase, atingindo os mais distintos sítios anatômicos do corpo humano (Hiller *et al.*, 2011). Este grupo de fungos, apesar de pertencer ao mesmo gênero, possui diferentes características morfológicas e bioquímicas, apresentando um genoma com grande variabilidade (Bennett, 2009).

Apesar de *C. albicans* ser a mais frequentemente isolada, infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA), como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica* e *C. norvegensis* têm se mostrado cada vez mais frequentes (Ng *et al.*, 1998; Kothavade *et al.*, 2010).

Entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, adquire importância *Candida glabrata* pela sua grande prevalência em infecções invasivas e superficiais, particularmente aquelas que atingem a mucosa oral, esôfago, vagina e trato urinário. Ainda, *C. parapsilosis* e *C. krusei* por estarem frequentemente envolvidas em candidemias (Cannon *et al.*, 1995; Pfaller, Diekema, 2007; Barbedo, Sgarbi, 2010). Por fim, *Candida tropicalis*, que recentemente foi classificada como a mais prevalente espécie de leveduras patogênicas do grupo *Candida* não-*albicans* (Kothavade *et al.*, 2010).

Ademais, a frequência da colonização por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal pode variar em indivíduos normais, sendo que a maioria dos autores relatam taxas que oscilam entre 20% a 40% da população (Vanden Abbeele *et al.*, 2008). Neste contexto, esta pesquisa avaliou a diversidade genética existente entre isolados de *Candida albicans* presentes em pacientes deste estudo, em comparação com isolados descritos na literatura. Descrever, ainda, quais espécies de *Candida* estão associadas a diferentes pacientes diabéticos e transplantados renais em relação a pacientes controle.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

Foi investigada a presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de 190 indivíduos, dos quais 64 eram pacientes diabéticos, 37 transplantados renais e 89 pacientes sem déficit imunológico (grupo controle). Os isolados da amostra clínica mais as 3 linhagens de referência de *Candida* da *American Type Culture Collection* (ATCC), das espécies *C. albicans* ATCC - 44858, *C. glabrata* ATCC - 2001 e *C. tropicalis* ATCC - 28707, totalizaram 120 leveduras analisadas. Ainda foi aplicado um questionário aos pacientes, para obter informações, como idade, gênero e o histórico clínico do paciente, a fim de traçar o perfil epidemiológico dos

isolados. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - CEPEH da Universidade Paranaense (UNIPAR), sob protocolo 19885.

Identificação fenotípica

Inicialmente quantificaram-se as leveduras através da determinação da unidade formadora de colônia (UFC) por mL de saliva. Em seguida, realizou-se a identificação presuntiva das espécies utilizando-se meio seletivo CHROMagar™ (Becton–Dickinson) e seguido de métodos convencionais, como provas bioquímicas de assimilação (auxonograma), fermentação de açúcares (zimograma), produção de tubo germinativo e micromorfologia em ágar fubá suplementado com tween 80% (Kurtzman, Fell, 1998).

Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de uma suspensão de colônias de leveduras, contendo aproximadamente 10^6 células/mL, que foram cultivadas em meio ágar batata-dextrose incubado a 25°C por 5 dias. A metodologia empregada para a extração de DNA seguiu o protocolo de extração do fabricante do Kit *Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit* (MoBio®). Após a extração, o DNA foi armazenado a -20°C.

Amplificação das regiões ITS1, gene 5.8S, ITS2 e gene 28S

A amplificação dos fragmentos ITS (*Internal Transcribed Spacers*) e gene 5,8S do DNA ribossomal, utilizou os *primers* V9G (De Hoog, Gerrits Van Den Ende, 1998) (5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3') e ITS4 (White, Morrow, 1990) (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), e a amplificação dos fragmentos do gene 28S do rDNA, utilizou os *primers* LR0R (5' ACCCGCTGAACTTAAGC 3') e LR5 (5'ATCCTGAGGGAACTTC 3') (Vilgalys, Hester, 1990) (Quadro 1). Cada reação de amplificação por PCR, foi realizada com volume total de 25 µL, contendo solução tampão com Tris-base (pH 8,4) (20 mM) e KCl (50 mM), deoxinucleotídeo trifosfato – dNTPs (0.3 mM) (Invitrogen-Life Technologies, Brasil), MgCl₂ (1,6 mM), *primers*

(15 pmol de cada), Taq DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen-Life Technologies, Brasil) e DNA (20 ng). A amplificação das regiões ITS e gene 5.8S utilizando o seguinte protocolo: 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 1 min, 57°C durante 1 min, 72°C durante 1 min e concluindo com 72°C durante 5 min. Já a amplificação da região 28S utilizou o protocolo: 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 1 min, 48°C durante 1 min, 72°C durante 1 min e concluindo com 72°C durante 5 min.

Quadro 1 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 e do gene 28S do DNA ribossomal de leveduras do gênero *Candida*.

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
V9G	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'	Hoog e Gerrits Van den Ende, 1998
ITS 4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	White e Morrow, 1990
LR0R	5' ACCCGCTGAACTTAAGC 3'	Vilgalys e Hester, 1990
LR5	5' ATCCTGAGGGAACTTC 3'	Vilgalys e Hester, 1990

Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% corado com GelRed®. Os resultados foram visualizados em um transiluminador com luz ultravioleta. Para a fotodocumentação usou o programa UVP Bio-Imaging Systems (2003 Labworks v4.6 Image Acquisition and analysis software. Upland, EUA).

Purificação dos produtos do PCR

Os produtos de PCR (25 µL) foram purificados utilizando acetato de amônia 7,5M (15 µL) e etanol PA (74 µL), seguido de incubação no gelo por 1 hora. A seguir os produtos foram centrifugados por 45 minutos a 23100 g. O *pellet* foi ressuspensionado em 12 µL de água MiliQ.

Sequenciamento do rDNA

Os produtos de PCR dos foram sequenciados seguindo o protocolo do Kit Big Dye (Amersham Biosciences[®]), o qual estipula a utilização de 50 ng do produto de PCR purificado, 0,25 μ M de *primer*, 2 μ L da mistura para sequenciamento ET (kit: DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE da Amersham Biosciences[®]) e água ultrapura para completar o volume final de 10 μ L. As mesmas condições da reação de sequenciamento foram utilizadas para todos os *primers*, com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94° C, 15 segundos a 50° C e 1 minuto a 60°C. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados com Sephadex[™] G-50 *Fine DNA Grade*, e submetidas à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE (Amersham Biosciences[®]).

Análise Filogenética

As sequências obtidas neste estudo foram alinhadas com sequências de referência adquiridas no banco de dados Genbank. Para o alinhamento e edição das sequências utilizou-se o programa MEGA 5.1 (Kumar *et al.*, 2008) e posterior observação visual, através do programa BioEdit 7.2.5 (Hall, 2013). Na análise de máxima verossimilhança utilizou-se o software GARLI (<http://www.molcularevolution.org>) e a inferência Bayesiana foi realizada através do software MrBayes v.3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2003). Para verificar a consistências dos nós utilizou-se o procedimento de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 2000 reamostragens. Nas análises fundamentadas em máxima verossimilhança e inferência Bayesiana, o software ModelTest versão 3.7 (Posada, Crandall, 1998) foi utilizado para fazer as comparações entre os diferentes modelos evolutivos. Na análise estatística foi desenvolvida a comparação das médias através de uma análise de variância (ANOVA) com uma significância de 0,05, quando o valor crítico apresentado se mostrou maior que o tabelado confirmou-se as diferenças com o Teste *t*.

RESULTADOS

Caracterização das leveduras isoladas dos pacientes

Os resultados de quantificação das leveduras mostraram que dos 190 pacientes analisados, 50,53% (96) apresentaram crescimento de leveduras, totalizando 120 isolados pertencentes ao gênero *Candida*. Ainda, verificou que dos 37 pacientes transplantados, houve crescimento em 51,35% (19) dos indivíduos, com uma média de unidade formadora de colônia por mL de saliva de 814 UFC/mL. Entre os 64 pacientes diabéticos, o percentual de crescimento foi de 68,75% (44), com a média de 932 UFC/mL. Já entre os 89 pacientes que formavam o grupo controle, a frequência de crescimento foi de 37,08% (33), com média de 215 UFC/mL de saliva (Tabela 1).

Quanto à frequência de isolamentos das espécies de leveduras do gênero *Candida*, entre os 120 isolados foi verificado que a espécie que apresentou maior número de isolamentos foi *C. albicans* (80), seguido de *C. parapsilosis* (17), *C. tropicalis* (8), *C. glabrata* (6), *C. dubliniensis* (4), *C. metapsilosis* (3) e *C. orthopsilosis* (2) (Tabela 1). Ainda, foi observado um predomínio de isolamento de *C. albicans* sobre as espécies *Candida não-albicans* independentemente do grupo de pacientes ($p=0,0001$).

O maior percentual de crescimento de leveduras bem como a maior média de UFC/mL foi observado nos pacientes diabéticos. Quando se comparou as médias de UFC/mL entre os grupos, observou-se que os pacientes diabéticos e transplantados apresentaram maiores médias de UFC/mL, sugerindo haver diferença no nível de colonização entre os pacientes e o grupo controle ($p=0,01$). Foram analisadas, também, as médias de UFC/mL entre as diferentes espécies e, observou que, *C. parapsilosis* possui a maior média com 879 UFC/mL, seguida de *C. tropicalis* (854), *C. albicans* (649), *C. glabrata* (520), *C. dubliniensis* (55), *C. metapsilosis* (47) e *C. orthopsilosis* (25).

Tabela 1: Aspectos epidemiológicos dos pacientes com isolamento de leveduras

Paciente	Características epidemiológicas		
	Frequência de isolamento ^a (n)	Média da UFC/mL ^b	Espécies isoladas ^c (n)
Transplantado	51,35% (19)	814	<i>Candida albicans</i> (15) <i>Candida parapsilosis</i> (1) <i>Candida glabrata</i> (2) <i>Candida tropicalis</i> (2) <i>Candida metapsilosis</i> (1) <i>Candida orthopsilosis</i> (1)
Diabético	68,75% (44)	932	<i>Candida albicans</i> (39) <i>Candida parapsilosis</i> (10) <i>Candida glabrata</i> (1) <i>Candida tropicalis</i> (5) <i>Candida dubliniensis</i> (1) <i>Candida metapsilosis</i> (2) <i>Candida orthopsilosis</i> (1)
Controle	37,08% (33)	215	<i>Candida albicans</i> (26) <i>Candida parapsilosis</i> (6) <i>Candida glabrata</i> (3) <i>Candida tropicalis</i> (1) <i>Candida dubliniensis</i> (3)

a: número de pacientes que possuíram isolamento de leveduras em amostra de saliva.

b: UFC/mL – Unidade Formadora de colônia por 1 mL saliva.

c: número de cada espécie de leveduras *Candida* isolado por tipo de paciente analisado.

Aspectos epidemiológicos

Analisando os dados obtidos através da entrevista realizada com aos indivíduos que participaram desta pesquisa, observou-se que o gênero dos pacientes não influenciou o crescimento de levedura na amostra de saliva, pois no gênero masculino o índice foi de (51,9%) e no feminino (49,8%) ($p=0,90$). A mesma constatação foi observada na correlação com a faixa etária, pois não houve diferença de crescimento entre os pacientes que tinham (< 50 anos), entre (51-60 anos) ou (>60 anos) ($p=0,09$). Ainda, observou-se que nos pacientes com histórico progresso de candidíase bucal o índice de crescimento foi (45,4%) e, nos sem histórico (54,6%), indicando que este fato não contribuiu com frequência de colonização ($p=0,13$).

Análise filogenética

Para verificar a similaridade genética dos isolados de *Candida albicans* deste estudo com isolados de pesquisas realizadas por outras universidades brasileiras, construiu-se uma árvore filogenética utilizando-se as sequências da

região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de 80 isolados, mais a linhagem de referência ATCC (44858) e linhagens da UFPR (HC04IC), USP (ICB 945), UFC (CA1150), UNICAMP (CA 70), UNESP (CA 15) e o isolado da UNIFESP (LEMI7986E) e (L8278). Utilizou-se sequência da linhagem “*Type Strain*” de *Candida albicans* CBS (562) (Tabela 2).

Tabela 2: Relação dos isolados de *Candida albicans* pertencentes a este trabalho e os isolados de pesquisas realizadas por universidades brasileiras e linhagens de referência.

Linhagem	Amostra	Origem	GenBank	
			ITS1-5.8S-ITS2	28S
CA_2_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361747	KM464557
CA_6_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361748	KM464558
CA_9_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361749	KM464559
CA_12_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361750	KM464560
CA_13_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361751	KM464561
CA_107_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361805	KM464615
CA_108_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361806	KM464616
CA_110_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361807	KM464617
CA_112_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361808	KM464618
CA_115_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361809	KM464619
CA_116_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361810	KM464620
CA_118_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361811	KM464621
CA_119_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361812	KM464622
CA_120_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361813	KM464623
CA_121_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361814	KM464624
CA_122_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361815	KM464625
CA_124_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361816	KM464626
CA_125_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361817	KM464627
CA_126_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361818	KM464628
CA_135_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361819	KM464629
CA_136_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361820	KM464630

CA_137_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361821	KM464631
CA_139_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361822	KM464632
CA_140_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361823	KM464633
CA_141_PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361824	KM464634
CA_154 _PC	Boca - paciente controle	UFPR	KM361825	KM464635
CA_19_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361752	KM464562
CA_21_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361753	KM464563
CA_22_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361754	KM464564
CA_25_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361755	KM464565
CA_26_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361756	KM464566
CA_28_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361757	KM464567
CA_29_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361758	KM464568
CA_30_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361759	KM464569
CA_31_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361760	KM464570
CA_32_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361761	KM464571
CA_33_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361762	KM464572
CA_35_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361763	KM464573
CA_38_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361764	KM464574
CA_39_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361765	KM464575
CA_43_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361766	KM464576
CA_69_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361782	KM464592
CA_70_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361783	KM464593
CA_71_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361784	KM464594
CA_72_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361785	KM464595
CA_73_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361786	KM464596
CA_76_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361787	KM464597
CA_79_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361788	KM464598
CA_81_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361789	KM464599
CA_84_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361790	KM464600
CA_85_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361791	KM464601

CA_86_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361792	KM464602
CA_87_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361793	KM464603
CA_90_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361794	KM464604
CA_91_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361795	KM464605
CA_92_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361796	KM464606
CA_93_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361797	KM464607
CA_95_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361798	KM464608
CA_96_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361799	KM464609
CA_98_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361800	KM464610
CA_99_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361801	KM464611
CA_100_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361802	KM464612
CA_102_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361803	KM464613
CA_104_PD	Boca - paciente diabético	UFPR	KM361804	KM464614
CA_46_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361767	KM464577
CA_47_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361768	KM464578
CA_49_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361769	KM464579
CA_51_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361770	KM464580
CA_52_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361771	KM464581
CA_54_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361772	KM464582
CA_57_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361773	KM464583
CA_58_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361774	KM464584
CA_59_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361775	KM464585
CA_61_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361776	KM464586
CA_62_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361777	KM464587
CA_63_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361778	KM464588
CA_66_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361779	KM464589
CA_67_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361780	KM464590
CA_68_PT	Boca - paciente transplantado	UFPR	KM361781	KM464591
HC04IC	Vagina	UFPR	KJ651886	-
ICB 945	-	USP	JX463265	-

CA1150	Sangue	UFC	AB861482	-
CA 70	Sangue	UNICAMP	DQ141236	-
CA 15	Peritônio	UNESP	KF385990	-
LEMI7986E	Sangue	UNIFESP	KC905077	-
L8278	Sangue	UNIFESP	KC408953	-
CBS562	Pele	CBS	NR125332	-
CA44858	Língua de papagaio	ATCC	KM361826	-

Analisando a figura 2, observa-se a formação de 2 grupos populacionais, onde o grupo A é composto pelo maior número de isolados e se enquadram as linhagens ATCC-44858, *Type Strain* (CBS562) e os isolados pertencentes a UFPR, USP, UFC, UNICAMP e UNESP. No grupo B encontram-se os isolados CA38PT e CA63PT e as linhagens LEMI7986E e L8278 da UNIFESP. Ainda, foi observado que os únicos isolados que apresentaram maior diversidade genética no grupo A, foi CA29PD, CA32PD, CA38PD, CA59PT, CA61PT, CA62PT, CA63PT e CA84.

Na árvore filogenética construída com as sequências dos 120 isolados, pertencentes a sete espécies de *Candida* spp foi observada uma separação consistente entre os isolados pertencentes às espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e para as três espécies que compõem o complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*). Ainda, foi possível observada baixa variabilidade intraespecífica (figura 3).

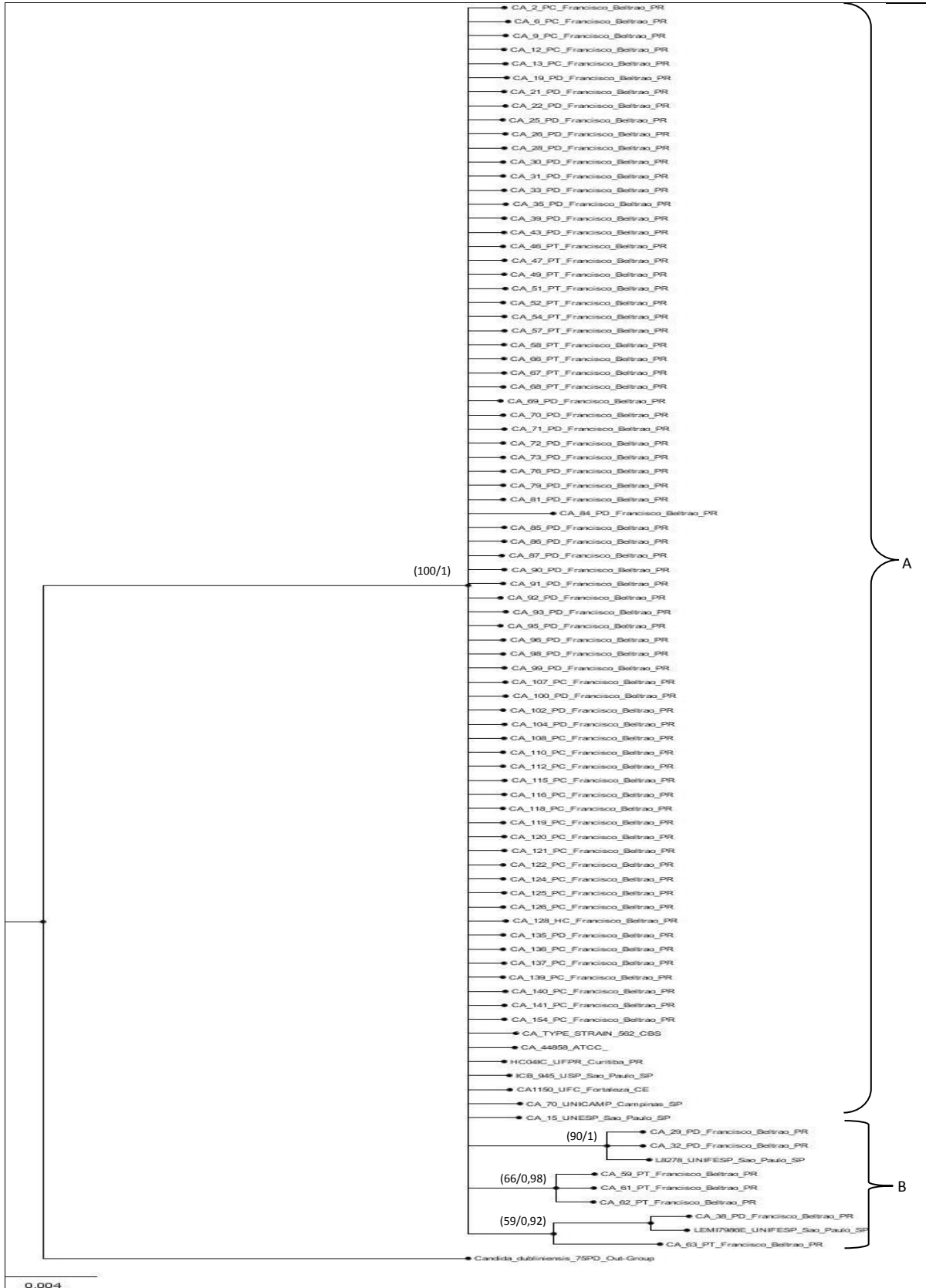


Figura 2 – Árvore filogenética da espécie *C. albicans* usando sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos isolados e linhagens de referência. Os valores de suporte estão apresentados à esquerda do nó, sendo os valores de *bootstrap* de Máxima Verossimilhança, seguidos dos valores referentes à probabilidade a *posteriori* da inferência Bayesiana, apresentados nesta ordem.

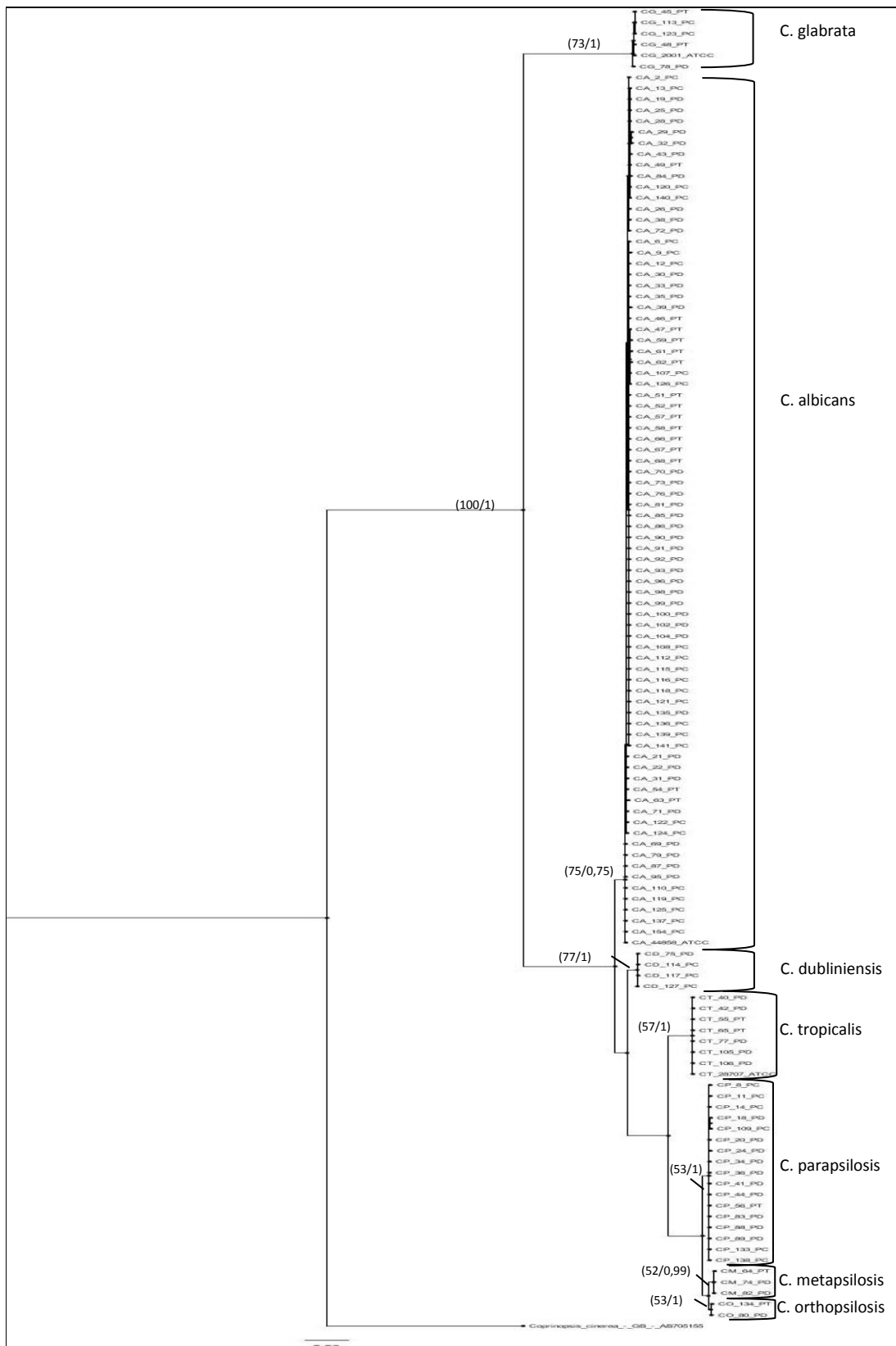


Figura 3– Árvore filogenética dos isolados e linhagens de referência de *Candida* spp gerada com seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2 e 28S do rDNA. Os valores de suporte estão apresentados à esquerda do nó, sendo os valores de *bootstrap* de Máxima Verossimilhança, seguidos dos valores referentes à probabilidade a *posteriori* da inferência Bayesiana, apresentados nesta ordem.

DISCUSSÃO

Caraterização das leveduras

A análise dos diferentes aspectos epidemiológicos das leveduras do gênero *Candida* possui importância, pois, além de proporcionar rotinas de prevenção, controle e tratamento da infecção, auxilia na escolha da conduta terapêutica adequada.

Ao se analisar a frequência de colonização entre os pacientes, foi observado um maior nível de colonização em transplantados renais e diabéticos (Tabela 1) indicando que pacientes que apresentam alteração da resposta imunológica são mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções fúngicas, coincidindo com os estudos de Kothavade *et al.* (2010).

Considerando o alto índice de colonização nos pacientes diabéticos, cabe discutir em específico os motivos desta condição. Colombo *et al.* (2012) relatam que diabetes *mellitus* é uma das principais condições patológicas que predis põem pacientes adultos ao desenvolvimento de diferentes formas clínicas de candidíase, como a candidíase oral, esofágica, vulvovaginal e candidúria, entre outras (Vazquez, Sobel 2002; Sobel *et al.*, 2011).

Resultados semelhantes ao deste estudo, referentes ao maior nível de colonização da mucosa oral de pacientes diabéticos por leveduras do gênero *Candida* (Tabela 1), também foram encontrados nas pesquisas desenvolvidas por Menezes *et al.* (2007), Sashikumar e Kannan (2010) e Obradović *et al.* (2011).

Assim, o alto índice de colonização da cavidade oral pelas leveduras *Candida* spp. em paciente diabéticos, parece ser um evento complexo e multifatorial, influenciado por fatores como a elevada concentração de açúcares (sacarose, glicose e frutose) nos tecidos e a baixa secreção salivar. Ambas as situações, características de pacientes diabéticos, possibilitam uma melhor adesão das leveduras do gênero *Candida* aos tecidos da mucosa oral (Treagan, 2008; Khovidhunkit *et al.*, 2009).

Os resultados mostraram que a espécie que apresentou maior frequência de isolamento entre todos os grupos de pacientes foi *Candida albicans* (Tabela 1), microrganismo comensal da cavidade oral, do trato gastrointestinal, urogenital e pele dos seres humanos (Calderone, 2002; Rodaki *et al.*, 2009; Leach *et al.*, 2011).

Um dos fatores que pode justificar a maior incidência desta espécie de levedura deve-se à sua alta capacidade em adaptar-se aos diferentes ambientes do hospedeiro humano (Zhou, Lorenz 2008; Yan *et al.*, 2009).

Outro aspecto que contribui para a grande frequência de isolamento desta levedura é a alta variabilidade da expressão gênica, que possibilita uma grande produção enzimática (proteínase, fosfolipase), auxiliando na formação de biofilme e aumentando a capacidade adesiva aos tecidos, contribuindo com os processos de colonização e patogenicidade (Noumi *et al.*, 2010). Um exemplo claro desta correlação entre colonização e patogenicidade é o fato de *Candida albicans* ser a espécie responsável por 90% dos episódios de candidíase oral e esofágica (Colombo *et al.*, 2012).

Todavia, merecem atenção os resultados referentes à quantificação das espécies que colonizaram a cavidade oral. Isto porque dos três grupos de pacientes que compunham a pesquisa, a terça parte dos isolados constituíram-se de espécies identificadas como *Candida* não-*albicans* (Tabela 1). Ou seja, apesar da espécie *C. albicans* ainda ser o principal patógeno envolvido na candidíase, nos últimos anos vem sendo observado um aumento significativo da prevalência de infecções onde o agente etiológico são espécies de *Candida* não-*albicans* (Arancia *et al.*, 2009), particularmente as espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Silva, 2013). Ainda, segundo Hsueh *et al.* (2005), a principal causa do aumento da colonização de espécies de *Candida* não-*albicans* está relacionada ao extenso uso profilático de drogas antifúngicas em pacientes imunocomprometidos.

A segunda espécie mais frequentemente isolada neste estudo foi *Candida parapsilosis*. Este resultado corrobora o estudo de Colombo *et al.* (2012), que classifica esta espécie como uma das mais frequentemente envolvidas em candidemia na América Latina, especialmente no Brasil, particularmente acometendo pacientes hospitalizados sob uso de cateter venoso central.

Aspectos epidemiológicos

A correlação entre a colonização de leveduras na cavidade bucal dos pacientes não apresentou relevância estatística quanto ao gênero, idade, nem histórico progresso de candidíase. Tais resultados corroboram Obradović *et al.* (2011), para quem a colonização na cavidade bucal não está relacionada ao gênero

dos pacientes investigados. De igual modo, confirma os estudos de Belazi *et al.* (2005) que não observou associação entre a candidíase oral e o gênero e idade dos pacientes.

Tal constatação evidencia que, para além de gênero, idade ou histórico progresso de candidíase, o aumento da frequência de candidíase bucal pode estar relacionado à falta de higiene bucal, a dietas específicas, à utilização de prótese dentária ou em associação a outras doenças da mucosa bucal (Hof, 2010).

Análise filogenética

A árvore filogenética na qual foi analisada a diversidade genética entre os isolados de *Candida albicans* (figura 2) demonstrou a formação de 2 grupos populacionais, sendo que o grupo A foi composto pelo maior número de isolados e onde se enquadram as linhagens ATCC (44858), *Type Strain* (CBS562) e os isolados pertencentes as coleções da UFPR, USP, UFC, UNICAMP e UNESP. Já o grupo B foi constituído por sete isolados e pelas linhagens pertencentes a UNIFESP.

Apesar de se observar a formação de dois grupos, houve baixa diversidade genética entre os isolados da presente pesquisa (UFPR) quando comparado com as linhagens de outras universidades. Além disso, observou-se que o tipo de paciente, seja transplantado renal, diabético ou grupo controle, não contribui para a formação de grupos filogenéticos específicos entre os isolados.

Neste sentido, estudos anteriores indicam que entre as leveduras envolvidas no processo de colonização ou infecção de um determinado sítio anatômico, é possível encontrar isolados de *Candida* spp apresentando pequenas variações gênicas, formando um genoma quase idêntico (Odds *et al.*, 2006). Tal condição, contudo, pode ser justificada pelo fato desta levedura, presente em diferentes sítios anatômicos do corpo humano, poder ter sido trocada de um indivíduo para outro, durante os processos de migrações populacionais, ocorridos nas últimas décadas, diminuindo a diversidade gênica (Odds *et al.*, 2008).

Por outro lado, estudos indicam que a maioria das pessoas é colonizada ou infectada por uma única estirpe desta levedura. Entretanto, pode haver maior diferença genética quando os isolados provirem de diferentes fontes geográficas (Soll, Pujol, 2003).

Ainda, segundo alguns autores a maior diversidade em uma população de *Candida albicans* pode estar relacionada às diferentes fontes de isolamento destas leveduras como observado nos trabalhos de Gurbuz e Kaleli (2010), Shin *et al.* (2011), Amouri *et al.* (2012), Hammarskjold *et al.* (2013).

Assim, a baixa variabilidade entre os isolados *Candida albicans* da presente pesquisa pode ser explicada pela proximidade geográfica dos pacientes investigados, tal como os estudos de Martens *et al.* (2007) e Aserse *et al.* (2012), para quem a obtenção de uma boa análise filogenética não basta analisar apenas um único gene.

Por fim, na análise dos dados referentes à árvore filogenética construída com as sequências das sete espécies de *Candida* spp (figura 3), verificou-se a formação de ramos distintos para cada espécie, com baixo grau de variabilidade intraespecífica. Quanto ao Complexo *Candida parapsilosis* (Roy, Meyer, 1998) foi observado que, apesar da proximidade genética entre as mesmas, é adequada a separação do complexo em espécies distintas, como cita Tavanti *et al.* (2005), sendo *C. parapsilosis* denominada de *sensu stricto* (correspondente ao grupo I), *C. orthopsilosis* (grupo II) e *C. metapsilosis* (grupo III) (Carvalho, 2011).

Conclusão

Em relação aos aspectos epidemiológicos de colonização da cavidade bucal dos pacientes analisados, foi possível observar frequência maior de colonização entre os pacientes diabéticos, sendo *C. albicans* a espécie com maior número de isolamentos, sem correlação com gênero, faixa etária ou histórico pregresso de candidíase bucal. Por fim, o polimorfismo gênico entre os isolados da espécie *C. albicans* possibilitou a divisão em dois grupos populacionais, os quais se assemelham geneticamente a linhagens de referência e a isolados de outros estudos brasileiros.

5.2 Artigo 2

POLIMORFISMO DO GENE *ERG11* DE ISOLADOS DE *Candida* PROVENIENTES DE PACIENTES DIABÉTICOS E TRANSPLANTADOS RENAIIS

Volmir Pitt Benedetti¹, Chirlei Glienke²

¹ Departamento de Microbiologia da Universidade Paranaense-Fco. Beltrão/PR.

² Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal do Paraná-UFPR.

Resumo

A candidíase é a micose oportunista mais frequente entre os humanos, sendo uma das principais causas de mortalidade em pacientes imunodeprimidos. O aumento da resistência aos antifúngicos torna a elaboração da conduta terapêutica uma tarefa difícil para o clínico. Entre os mecanismos envolvidos na resistência destacam-se as alterações genéticas no gene *ERG11*. Neste contexto, o objetivo foi investigar o polimorfismo no gene *ERG11* de isolados de levedura *Candida* spp e correlacionar com o padrão de suscetibilidade ao fluconazol. Foram Investigados o polimorfismo em fragmentos do gene *ERG11* de 80 isolados de *C. albicans*, 8 de *C. tropicalis* e 6 de *C. glabrata*, oriundos da saliva de diferentes grupos de pacientes e correlacionou-se a concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol, realizado pela técnica do E-test[®]. Apesar de todos os isolados serem sensíveis ao fluconazol, a maior média de CIM foi de *C. glabrata* (3,14 µg/mL). Foram identificadas as mutações F105L, D116E, K119N, S137L e K128T em isolados de *C. albicans* e T224C e G263A de *C. tropicalis*, as quais já foram descritas em outros trabalhos. O polimorfismo encontrado nos fragmentos do gene *ERG11* não provocou diminuição no padrão de suscetibilidade dos isolados frente ao antifúngico fluconazol.

Palavras chave: *Candida*, Fluconazol, Gene *ERG11*, Polimorfismo.

Introdução

A candidíase é a micose oportunista mais frequente entre os humanos, sendo uma das principais causas de mortalidade em pacientes imunodeprimidos (Hung *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). A escolha da droga antifúngica adequada para o tratamento destas infecções é uma tarefa difícil em face do evento denominado Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) ou fenômeno MDR (Kouidhi *et al.*, 2010).

As infecções causadas por *Candida* spp são comumente tratadas com antifúngicos azólicos, principalmente, o fluconazol (Pinjon *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2008). Pode ocorrer, contudo, resistência aos fungicidas azólicos seja pela exposição contínua à droga, ou pela resistência intrínseca a estes antifúngicos (Orozco *et al.*, 1998; Cannon *et al.*, 2007).

Entre as espécies de leveduras do gênero *Candida*, a espécie *C. albicans* é a mais frequentemente envolvida em infecções superficiais e invasivas, nos diferentes sítios anatômicos do corpo humano, sendo naturalmente sensível aos antifúngicos sistêmicos, casualmente resistente aos polienos como a anfoteromicina B, havendo poucos relatos de resistência às equinocandinas. A resistência aos fungicidas azólicos, por sua vez, está geralmente associada à exposição prolongada a estes fármacos (Sanglard, Odds, 2002; Ben-Ami *et al.*, 2011).

Distintos mecanismos moleculares são utilizados pelas leveduras *Candida* para produzir resistência às drogas antifúngicas e, particularmente, à classe dos azóis. Entre estes mecanismos encontram-se as bombas de efluxo, as alterações na biossíntese do ergosterol e as alterações mutacionais e expressão de genes (White *et al.*, 2002; Chau *et al.*, 2004).

Quanto aos genes, sugere-se que *CDR1*, *CDR2*, *PDR16* (Coste *et al.*, 2007; Znaidi *et al.*, 2007), *MDR1*, *RTA2*, *FLU1* (Calabrese *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2008), *ERG11* (Dunkel *et al.*, 2008) e *ERG3* (Loeffler, Stevens, 2003), possuam particular importância no desenvolvimento de resistência frente aos antifúngicos, particularmente entre a classe dos azólicos (Znaidi *et al.*, 2009).

No caso dos genes *ERG11* e *ERG3*, estes codificam proteínas envolvidas na biossíntese do ergosterol, composto fundamental para que a célula fúngica possa manter a integridade e as funções da membrana plasmática (Akins, 2005; Yan *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008).

Os antifúngicos azólicos agem inibindo a biossíntese do ergosterol, através da inativação da enzima 14 α -demetilase, de modo que isto resulta na diminuição do ergosterol disponível para as membranas e no acúmulo de metabólitos intermediários (Loeffler, Stevens, 2003; Manastir *et al.*, 2009). Mutações em pontos específicos no gene *ERG11* e gene *ERG3* provocariam perda da capacidade dos antifúngicos azóis em bloquear a síntese do ergosterol e, com isto, aumentariam a tolerância destas leveduras a este grupo de antifúngicos (Akins, 2005; Yan *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008).

Ainda, alterações na atividade da enzima lanosterol 14 α -demetilase também podem ocorrer pelo aumento da expressão do gene *ERG11*, o que resulta em aumento da concentração da enzima no espaço intracelular. Este fato exige a necessidade de uma maior concentração do antifúngico para provocar a inibição da atividade enzimática. Tal mecanismo molecular, encontrado em diversos isolados de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol, isoladamente, não produz resistência. Entretanto, quando associado ao aumento da expressão de genes que codificam as bombas de efluxo, pode estar envolvido na resistência de leveduras *Candida* aos antifúngicos azólicos (Perea *et al.*, 2001; Goldman *et al.*, 2004).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar o polimorfismo no gene *ERG11* de isolados de levedura *Candida* spp e os correlacionar com o padrão de suscetibilidade ao fluconazol.

Materiais e métodos

Identificação dos isolados

Analisaram-se leveduras do gênero *Candida* isoladas da saliva de 190 indivíduos, sendo estes compostos por 64 pacientes diabéticos, 37 transplantados renais e 89 pacientes sem déficit imunológico (grupo controle). Para o teste de antifungigrama e análise do polimorfismo do gene *ERG11*, foram selecionadas 80 leveduras da espécie *Candida albicans*, 6 da espécie *Candida glabrata* e 8 de *Candida tropicalis*. Utilizou-se 3 linhagens de referência de *Candida* da *American Type Culture Collection* (ATCC) com concentração inibitória mínima (CIM) para o fluconazol conhecidos, pertencentes a espécies *Candida albicans* ATCC – 44858 (CIM - 1 μ g/mL), *Candida glabrata* ATCC – 2001 (CIM - 4 μ g/mL) e *Candida tropicalis* ATCC - 28707 (CIM - 2 μ g/mL), usadas como padrão de referência para os testes de determinação do CIM para o antifúngico fluconazol. Para a identificação presuntiva dos isolados, utilizou-se o meio CHROMagar[®] (Becton–Dickinson) e métodos convencionais, como testes de assimilação de carboidrato, produção de tubo germinativo e micromorfologia em ágar fubá, suplementado com tween 80% (Kurtzman, Fell, 1998). Para a identificação molecular dos isolados, utilizou-se a amplificação por reação de PCR, seguido de sequenciamento automatizado de

sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA (Knutsen *et al.*,2007). E de fragmentos do gene 28S (Vilgalys, Hester, 1990).

Determinação da concentração inibitória mínima ao antifúngico fluconazol

A avaliação da suscetibilidade das leveduras com determinação da CIM ao fluconazol foi realizada utilizando o E-test (Biomerieux[®]), em ágar Mueller-Hinton (Difco[®]), suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno, de acordo com o documento M44-A2, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Os critérios utilizados para classificação dos padrões de suscetibilidade seguiu o documento M27-A3, no qual as leveduras do gênero *Candida* são classificadas como suscetíveis ao fluconazol para valores de CIM igual ou inferior a 8 µg/mL, suscetibilidade dose-dependente para valores de CIM entre 16 e 32 µg/mL, e resistentes quando a concentração inibitória mínima que inibe o crescimento for igual ou superior a 64 µg/mL (CLSI, 2008).

Extração do DNA de *Candida*

O DNA genômico foi extraído a partir de uma suspensão de colônias de leveduras, contendo aproximadamente 10⁶ células/mL, que foram cultivadas em meio ágar batata-dextrose incubado a 25°C por 5 dias. A metodologia empregada para a extração de DNA seguiu o protocolo de extração do fabricante do Kit *Ultractean Microbial DNA Isolation Kit* (MoBio[®]). Após a extração, o DNA foi armazenado a -20°C.

Amplificação de fragmentos do gene ERG 11

Os fragmentos do gene *ERG11* foram amplificados por PCR e sequenciados utilizando os *primers* Sec1A: (5'-TTAGTGTTTTATTGGA TTCCTTGGTT-3') e Sec1B: (5'-TCTCATTTTCATCACCAAATAAAGATC-3') para *C. albicans*, conforme descrito por Xu *et al.* (2008) (X13296). Para *C. tropicalis* utilizou-se F: (5'-TCTTTTGTCAACACAGTAATGGC-3') e R: (5'- AACACCT TTAC CAAAACAGGAG-3') (AY942646) e, para *C. glabrata* F: (5'-ACTACAATAAC ATGTCCACTGA-3') e R: (5'-GGGTGGTCAAGTGGGAGTAA-3') (EU219981). Os *primers* utilizados neste

estudo amplificam fragmentos de 407 a 482 pares de bases do gene *ERG11* (Quadro 2). Amplificação por PCR utilizou um volume total de 25 µL solução, em água ultrapura contendo 2,5 µL de tampão 10X para PCR, 1,6 mM de MgCl₂, 0,3 mM de uma mistura de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 20 ng de DNA extraído e 0,8 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). A amplificação parcial do gene *ERG11* foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C para *C. albicans*, ou 1 minuto a 64°C para *C. tropicalis*, e 1 minuto a 62°C para *C. glabrata*, 1 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 5 minutos a 72°C (Carvalho, 2011). Os produtos de PCR foram purificados adicionando 7 µL de acetato de amônio 7,5 M e 60 µL de etanol absoluto. Após homogeneização, as amostras foram inseridas no gelo por um período de 1 hora, sendo em seguida centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm a 25°C, com posterior descarte do sobrenadante. O pellet formado foi lavado com 100 µL de etanol 70%, sendo em seguida centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos, sendo em seguida deixado para secagem overnight. Após o transcorrer do período o produto purificado foi ressuspensionado em 13 µL de água ultrapura. Após a purificação o produto do PCR foram visualizado e quantificado em gel de agarose 1,5% (p/v).

Quadro 2 – Primers que amplificam fragmentos do gene *ERG11* de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*.

Espécie	Gene	Primer	Região amplificada	Tamanho do fragmento
<i>C. albicans</i> (GenBank-X13296) Xu et al., 2008	1851 pb	ERGSec1A (5'-TTAGTGTTTTATTGGATTCCCTTGTT-3') ERGSec1B (5'-TCTCATTTTCATCACCAAATAAAGATC-3')	295 a 777 pb	482 pb
<i>C. glabrata</i> (GenBank-159461713)	2669 pb	CgERGr1-F:(5' – ACTACAATAACATGTCCACTGA - 3') CgERGr1-R:(5' – GGGTGGTCAAGTGGGAGTAA - 3')	550 a 957 pb	407 pb
<i>C. tropicalis</i> (GenBank-61189833)	2446 pb	CtERGr1-F:(5'- TCTTTTGTCAACACAGTAATGGC-3') CtERGr1-R:(5' – AACACCTTTACCAAAAACAGGAG-3')	500 a 907 pb	407 pb

Sequenciamento de fragmentos do gene *ERG11*

Para reação de sequenciamento dos produtos de PCR dos fragmentos do gene *ERG11*, foi utilizado de 50 ng do produto de PCR purificado, 0,25 µM de primer, 2 µL da mistura para sequenciamento ET (kit: DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE da Amersham Biosciences®) e água ultrapura

quando necessária para completar o volume final de 10 µL. As mesmas condições da reação de sequenciamento foram utilizadas para todos os *primers*, iniciando a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94° C, 15 segundos a 50° C e 1 minuto a 60° C. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados com Sephadex™ G-50 *Fine DNA Grade*, e submetidas à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE (Amersham Biosciences®). Para o alinhamento das sequências utilizou-se os programas MEGA 5.1 e ClustalW2, com posterior observação visual, através do programa BioEdit versão 7.2.

Resultados

Suscetibilidade ao fluconazol dos isolados de *Candida*

Na análise do padrão de sensibilidade frente ao fluconazol dos 94 isolados pertencentes às espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, verificou-se que todos os isolados eram suscetíveis ao fluconazol, com valores da CIM inferior a 8 µg/mL, segundo os critérios do documento M27-A3 da CLSI (2008).

As médias da CIM de fluconazol entre as espécies foi de 1,44 µg/mL para *C. albicans*, 2 µg/mL para *C. tropicalis* e, com maior média *C. glabrata*, com 3,14 µg/mL ($p=0,02$). Já às médias da CIM de fluconazol dos isolados da espécie *C. albicans* entre os grupos de pacientes, observou-se maior média entre os pacientes transplantados (1,83 µg/mL) e diabéticos (1,63 µg/mL) em comparação ao grupo controle (0,95 µg/mL) ($p=0,0001$) (Tabela 3).

Polimorfismo do gene *ERG11* em espécies de *Candida*

Sequenciou-se fragmento único do gene *ERG11*, distinto para cada espécie. Nos fragmentos de 482 pb, dos 80 isolados de *C. albicans*, verificou-se a presença de 134 alterações de nucleotídeos. Já entre os 8 isolados de *C. tropicalis* encontrou-se 12 alterações de nucleotídeos em fragmentos de aproximadamente 407 pb. Por fim, entre os 6 isolados de *C. glabrata* não se observou alterações de nucleotídeos nos fragmentos de 407 pb do gene *ERG11*. Ainda, sobre a frequência com que estas mutações ocorrem, observou-se que em 32,9% (31) dos isolados não houve

nenhuma alteração de nucleotídeos nos fragmentos analisados. Já em 67,1% (63) dos isolados ocorreu algum tipo de mutação e, destes, 19,1% (18) apresentavam apenas um evento mutacional, 21,3% (20) apresentavam dois eventos, em 17,1% (16) ocorreram três alterações e em 9,6%(9) verificou-se mais de três eventos mutacionais no fragmento do gene *ERG11* analisado (Tabela 3).

Tabela 3- Polimorfismo em sequências de nucleotídeos do gene *ERG11* de *C. albicans* e *C. tropicalis* e sua correlação com a substituição de aminoácido da *Erg11p*.

Isolado*	Paciente	Tipo de mutação **	Substituição de aminoácidos***	CIM µg/mL
CA_112_PC	Controle	Sentido trocado	K128T	0,2
CA_2_PC	Controle	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / K128T	0,5
CA_13_PC	Controle	Sinônima	F105L / K119N	0,5
CA_30_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K128T	0,5
CA_136_PC	Controle	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / K128T	0,5
CA_141_PC	Controle	Sinônima	F105L	0,5
CA_35_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / S137L / K128T	0,75
CA_57_PT	Transplantado	Sinônima	F105L	0,75
CA_79_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / S137L / K128T	0,75
CA_115_PC	Controle	Sinônima / Sentido trocado	F105L / S137L / K128T	0,75
CA_124_PC	Controle	Sinônima	F105L / D116E	0,75
CA_12_PC	Controle	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K128T	1,0
CA_21_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K128T	1,0
CA_25_PD	Diabético	Sinônima	F105L	1,0
CA_29_PD	Diabético	Sinônima	F105L / D116E / K119N / S137L	1,0
CA_38_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / S137L / K128T	1,0
CA_46_PT	Transplantado	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / K128T	1,0
CA_91_PD	Diabético	Sinônima	F105L	1,0
CA_100_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / K128T	1,0
CA_128_PC	Controle	Sinônima	F105L / D116E / K119N / S137L	1,0
CA_137_PC	Controle	Sinônima	F105L / S137L	1,0
CA_135_PD	Diabético	Sinônima	F105L	1,0
ATCC- 44858	Língua de papagaio	Sinônima	F105L / D116E / S137L	1,0
CA_9_PC	Controle	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / K128T	1,5
CA_22_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / K128T	1,5
CA_28_PD	Diabético	Sinônima	F105L	1,5
CA_31_PD	Diabético	Sinônima	F105L	1,5
CA_33_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / D116E / S137L / K128T	1,5
CA_39_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K128T	1,5
CT_40_PD	Diabético	Sinônima	G263A	1,5
CT_42_PD	Diabético	Sinônima	G263A	1,5
CA_51_PT	Transplantado	Sinônima	F105L / K119N	1,5
CA_52_PT	Transplantado	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K128T	1,5
CT_55_PT	Transplantado	Sinônima	T224C / G263A	1,5
CA_76_PD	Diabético	Sinônima	F105L / D116E / K119N / S137L	1,5
CA_81_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / S137L / K128T	1,5
CA_86_PD	Diabético	Sinônima	F105L / D116E / K119N	1,5
CA_90_PD	Diabético	Sinônima	F105L	1,5
CA_104_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / K128T	1,5
CA_118_PC	Controle	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / K128T	1,5
CA_122_PC	Controle	Sinônima	F105L	1,5
CT_129_PC	Controle	Sinônima	T224C / G263A	1,5
CA_19_PD	Diabético	Sinônima	F105L	2,0
CA_32_PD	Diabético	Sinônima	F105L / D116E	2,0
CA_43_PD	Diabético	Sinônima	F105L / D116E	2,0
CA_49_PT	Transplantado	Sinônima	F105L	2,0
CA_58_PT	Transplantado	Sinônima	F105L / K119N	2,0
CA_63_PT	Transplantado	Sinônima	F105L / K119N / S137L	2,0

CA_69_PD	Diabético	Sinônima	F105L / K119N / S137L	2,0
CA_70_PD	Diabético	Sinônima	F105L / D116E / K119N	2,0
CA_72_PD	Diabético	Sinônima	F105L	2,0
CA_73_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K128T	2,0
CT_77_PD	Diabético	Sinônima	T224C / G263A	2,0
CA_84_PD	Diabético	Sinônima	F105L / D116E / K119N / S137L	2,0
CA_92_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / D116E / K119N / S137L / K128T	2,0
CA_93_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K128T	2,0
CA_98_PD	Diabético	Sinônima / Sentido trocado	K119N / K128T	2,0
CA_99_PD	Diabético	Sinônima	F105L	2,0
CT_105_PD	Diabético	Sinônima	T224C / G263A	2,0
CT_106_PD	Diabético	Sinônima	T224C / G263A	2,0
CA_121_PC	Controle	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K128T	2,0
ATCC- 28707	Pielonefrite	Sinônima	T224C / G263A	2,0
CA_62_PT	Transplantado	Sinônima	F105L	3,0
CA_67_PT	Transplantado	Sinônima / Sentido trocado	F105L / K119N / K128T	3,0
CA_85_PD	Diabético	Sinônima	F105L / D116E / K119N / S137L	3,0
CA_96_PD	Diabético	Sinônima	F105L	3,0
CA_102_PD	Diabético	Sinônima	F105L	3,0

*A sigla CA corresponde à espécie *Candida albicans* e CT a *Candida tropicalis*.

**As mutações identificadas como F105L, D116E, K119N, S137L, T224C e G263A foram classificadas como sinônimas e K128T de sentido trocado.

***As mutações aqui relatadas foram identificadas utilizando-se como referência os trabalhos publicados por Vandeputte *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2008 e Wang *et al.*, 2009.

Analisando a natureza das alterações, verificou-se que 82,9% (121) era mutação sinônima, presente entre os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* e, 17,1% (25) mutações de sentido trocado, observadas apenas na espécie *C. albicans*. Na espécie *C. albicans* a mutação sinônima ocorreu 41,8% (56) no aminoácido Lisina (lys) (F105L), 9,7% (13) na Leucina (Leu) (D116E), 18,7% (25) na Arginina (Arg) (K119N) e 11,1% (15) na Fenilalanina (Phe) (S137L). Já na espécie *C. tropicalis* a mutação sinônima ocorreu 41,7% (5) no aminoácido Treonina (Thr) (T224C) e 58,3% (7) na Asparagina (Asn) (G263A). A mutação de sentido trocado foi observada apenas em 18,7% (25) dos isolados da espécie *C. albicans*, na qual ocorreu a troca de uma Adenina (purina) por uma Citosina (pirimidina), caracterizando uma transversão que resultou na alteração do aminoácido Fenilalanina (Phe) para uma Cisteína (Cys) (Tabela 3). Esta alteração ocorrida no códon situado entre as posições 529 - 531 do gene da *CaERG11*, foi identificada por Löffler *et al.* (1997) como K128T. Finalmente observou-se que das 25 mutações de sentido trocado que ocorreram entre os isolados deste estudo, 92% (23) estavam em heterozigose e 8% (2) estavam em homozigose.

Discussão

Padrão de suscetibilidade ao fluconazol

Neste estudo todos os isolados foram classificados como sensíveis ao fluconazol (CIM < 8 µg/mL), segundo os padrões estipulados pela CLSI (2008), documento M27-A3. Entretanto, observou-se diferença nas médias da CIM de fluconazol. Verificou-se que os isolados oriundos dos indivíduos que formavam o grupo controle apresentaram a menor média da CIM e, que os isolados obtidos dos pacientes transplantados renais, apresentaram as maiores médias. Este dado pode ser explicado pela composição do grupo de paciente controle, formado por indivíduos saudáveis, que não apresentavam histórico recente de candidíase bucal e, provavelmente, com menor índice de exposição aos antifúngicos azólicos que os pacientes transplantados.

Segundo Qiao *et al.* (2008), a exposição repetida aos antifúngicos, principalmente aos azóis, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da resistência a este tipo de droga (Sanglard, 2002; Yan *et al.*, 2009). Ademais, outro aspecto que pode explicar a maior média da CIM de fluconazol, entre os isolados provenientes dos pacientes transplantados, é o fato de que estes pacientes induzem a um estresse celular, devido ao uso de drogas (quimioterápicos, corticosteróides, antibióticos), induzindo a levedura a ativar seus mecanismos de resistência, resultando na redução do seu perfil de suscetibilidade (Morschhäuser, 2010).

Outro aspecto observado referente à CIM de fluconazol foi a diferença das médias entre as espécies, pois a espécie *C. albicans* apresentou a menor média, seguida de *C. tropicalis*, verificando-se a maior média na espécie *C. glabrata*. Este achado coincide com o estudo de Barbedo e Sgarbi (2010), onde houve menor padrão de suscetibilidade da espécie *C. glabrata* frente ao fluconazol, particularmente entre pacientes que tiveram exposição prévia a este antifúngico (Pfaller *et al.*, 2001).

Polimorfismo do gene *ERG11*

Os resultados da análise de polimorfismo em fragmento do gene *ERG11* das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, indicaram a presença de 146 substituições, sendo 121 na espécie *C. albicans* e 25 na espécie *C. tropicalis*. O polimorfismo do gene *ERG11* é apontado como uma das principais causas que levam à resistência aos antifúngicos azóis. Isto ocorre devido à alteração do sítio de ligação do antifúngico à enzima-alvo *Erg11p* (lanosterol 14 α -demetilase) (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006; Maccallum *et al.*, 2010).

As mutações do gene *ERG11* foram encontradas em fragmentos com tamanho de aproximadamente 400 pb a 480 pb. Estas mutações foram identificadas como F105L, D116E, K119N, K128T e S137L na espécie *C. albicans* e T224C e G263A na espécie *C. tropicalis* (Tabela 3).

Outros autores, investigando o polimorfismo no gene *ERG11* de isolados clínicos de leveduras do gênero *Candida*, também já relataram a presença destas mutações entre seus isolados. As mutações F105L, D116E e K128T já foram citadas por Marichal *et al.* (1999), Xu *et al.* (2008), Carvalho (2011) e, a mutação S137L, também foi encontrada no trabalho realizado por Wang *et al.* (2009). As mutações T224C e G263A encontradas entre os isolados de *C. tropicalis* foram citadas em trabalho realizado por Vandeputte *et al.* (2005).

As mutações ocorridas em isolados da espécie *C. albicans*, sensíveis ao fluconazol, denominadas de D116E, K128T, K119N também foram encontradas em trabalhos como os de Sanglard *et al.* (1998), Xu *et al.* (2008), Carvalho (2011). Estas mutações não são apontadas como relacionadas à resistência ao fluconazol (Tabela 3). Já a mutação F105L, presente neste estudo, também foi identificada em isolados resistentes ao fluconazol no trabalho desenvolvido por Löffler *et al.* (1997). Contudo, como citam Marichal *et al.* (1999), White *et al.* (2002) e Goldman *et al.* (2004), esta mutação ocorre em um local da *Erg11p* que não altera a conformação estrutural do sítio de ligação da enzima com o fluconazol, e conseqüentemente não influenciando no padrão de suscetibilidade frente a esta droga.

A mutação S137L, encontrada neste estudo, também foi observada no isolados de Wang *et al.* (2009), que depositou a sequência no GenBank (FJ159444). Esta mutação não é descrita com frequência por outros autores, mas acredita-se

que não tenha correlação com a resistência ao fluconazol, pois foi identificada em isolados sensíveis a este antifúngico.

As mutações T224C e G263A encontradas em isolados da espécie *C. tropicalis* também foram descritas por Vandeputte *et al.*(2005). Todavia, tal como neste estudo, não estavam relacionadas a isolados resistentes ao fluconazol. Acredita-se que estas alterações no gene *CtERG11*, não influenciam o padrão de suscetibilidade da levedura frente ao fluconazol (Tabela 3).

Outro dado analisado neste estudo refere-se ao tipo de mutação ocorrida nos fragmentos de gene *ERG11*. Observou-se que a maioria das mutações encontradas nos fragmentos era do tipo sinônima (F105L, D116E, K119N, S137L, T224C e G263A) (Tabela 3). Apesar da mutação sinônima não provocar a alteração de aminoácido, acredita-se que estas alterações genéticas podem exercer grande efeito sobre a proteína, como no caso da remoção dos íntrons para a formação do RNAm (Wang, Cooper, 2007). Estas alterações nos nucleotídeos, mesmo sem alterar o aminoácido, podem influenciar na conformação estrutural da molécula (dobramento do RNAm) e, com isto, alterar a estabilidade e a velocidade de tradução da molécula (Nackley *et al.*, 2006).

A mutação K128T de sentido trocado, identificada entre os isolados de *Candida albicans*, não influenciou no padrão de suscetibilidade destes isolados. Segundo Marichal *et al.* (1999) e Goldman *et al.* (2004), algumas mutações ocorrem em locais do gene *Erg11*, sem provocar alterações no sítio de ligação da droga e, conseqüentemente, não induzem à resistência ao antifúngico.

Outro aspecto analisado nas mutações não sinônimas foi a disposição dos alelos (homozigose e heterozigose). Nos isolados de *C. albicans* com este tipo de mutação, verificou-se que a maioria apresentava alelos em heterozigose. A mudança de heterozigose para homozigose identificada em nucleotídeos do gene *ERG11*, pode contribuir com diminuição da sensibilidade ao fluconazol (Sasse *et al.*, 2012). Porém, o papel que estas alterações alélicas exercem sobre os mecanismos de resistência dos fungos, ainda não está completamente elucidado (Lee *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009).

Assim, a investigação do polimorfismo em genes envolvidos nos mecanismo de resistência a drogas antifúngicas, como o observado no *ERG11*, é um trabalho árduo que está longe de ser completamente concluído, pois existem dúvidas relevantes que precisam ser completamente elucidadas.

Conclusão

Na investigação do perfil de suscetibilidade *in vitro* ao fluconazol, apesar de todos os isolados serem sensíveis (CIM < 8 µg/mL), observou-se maior média de concentração inibitória mínima entre os isolados de *Candida glabrata*. No que tange ao polimorfismo encontrado nos fragmentos do gene *ERG11*, identificou-se em *C. albicans* as mutações F105L, D116E, K119N, e S137L do tipo sinônima e K128T de sentido trocado. Em *C. tropicalis* foram encontradas as mutações T224C e G263A, sendo estas do tipo sinônimas. Todavia, na espécie *C. glabrata* não foi observado polimorfismo no fragmento analisado. Ainda observou-se que o polimorfismo encontrado em fragmentos do gene *ERG11* não provocaram alterações no padrão de suscetibilidade dos isolados frente ao antifúngico fluconazol.

6. DISCUSSÃO

A observação de um maior nível de colonização em transplantados renais e diabéticos, corrobora com as pesquisas que indicam que pacientes que apresentam alteração da resposta imunológica são mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções fúngicas.

A espécie de levedura que apresentou maior frequência de isolamento entre todos os grupos de pacientes foi *Candida albicans* (Tabela 1), o que pode ser explicado por sua alta capacidade em adaptação aos diferentes ambientes do hospedeiro humano (Zhou, Lorenz 2008; Yan *et al.*, 2009).

Ao se correlacionar a colonização de leveduras na cavidade bucal dos pacientes, não se observou diferença estatística quanto ao gênero, idade, nem histórico pregresso de candidíase.

A análise da diversidade genética entre os isolados de *Candida albicans* (figura 2), a árvore filogenética demonstra a formação de 2 grupos populacionais, sendo que o grupo A é composto pelo maior número de isolados e onde se enquadram as linhagens ATCC (44858), *Type Strain* (CBS562) e os isolados pertencentes as coleções da UFPR, USP, UFC, UNICAMP e UNESP, e o grupo B formado por sete isolados deste estudo e as linhagens da UNIFESP. Apesar de se observar a formação de dois grupos, houve baixa diversidade genética entre os isolados da presente pesquisa e as linhagens de outras universidades. Além disso, observou-se que o tipo de paciente não contribuiu para a formação de grupos filogenéticos específicos entre os isolados, o que pode ser explicado pela proximidade geográfica dos pacientes investigados, tal como os estudos de Martens *et al.* (2007) e Aserse *et al.* (2012).

Com relação ao padrão de sensibilidade, todos os isolados foram classificados como sensíveis ao fluconazol (CIM < 8 µg/mL), segundo os padrões estipulados pela CLSI (2008), documento M27-A3. Entretanto, observou-se diferença nas médias da CIM de fluconazol. Verificou-se que os isolados oriundos dos indivíduos que formavam o grupo controle apresentaram a menor média da CIM e, que os isolados obtidos dos pacientes transplantados renais, apresentaram as maiores médias. Este dado pode ser explicado pela composição do grupo de paciente controle, formado por indivíduos saudáveis, que não apresentavam

histórico recente de candidíase bucal e, provavelmente, com menor índice de exposição aos antifúngicos azólicos que os pacientes transplantados.

Os resultados da análise de polimorfismo em fragmento do gene *ERG11* das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, indicaram a presença de 146 alterações mutagênicas, sendo 121 na espécie *C. albicans* e 25 na espécie *C. tropicalis*. Na espécie *C. glabrata* não foi observado polimorfismo nos fragmentos do gene analisados. As mutações do gene foram identificadas como F105L, D116E, K119N, K128T e S137L na espécie *C. albicans* e T224C e G263A na espécie *C. tropicalis*, (Tabela 3), semelhante a achados de Sanglard *et al.* (1998), Marichal *et al.* (1999), Vandeputte *et al.* (2005), Xu *et al.* (2008), Wang *et al.* (2009) e Carvalho (2011). Este achado indica que, efetivamente, tais mutações não são exclusivas dos isolados do presente estudo e que, possivelmente, os eventos de polimorfismos no gene *ERG11* segue um padrão.

Nas análises executadas nesta pesquisa não foram observados novos pontos de polimorfismo no gene *ERG11* entre os isolados das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Isto, provavelmente, deve-se ao fato de que neste estudo não foi realizada a análise completa do gene *ERG11* que pode variar de 1851 a 2669 pb dependendo da espécie de levedura investigada e, sim, apenas um fragmento de aproximadamente 480 pb.

Em síntese, os polimorfismos encontrados no gene *ERG11*, tanto de isolados *C. albicans* quanto *C. tropicalis*, não foram significativos a ponto de alterar a estrutura molecular do sítio de ligação do fluconazol na enzima *Erg11p*. Como consequência, não houve decréscimo no padrão de suscetibilidade dos isolados.

7. CONCLUSÃO

Em relação aos aspectos epidemiológicos de colonização da cavidade bucal dos pacientes analisados, foi possível observar uma frequência maior de colonização entre os pacientes diabéticos, sendo *C. albicans* a espécie com maior número de isolamentos. Isto ocorreu, provavelmente, porque *C. albicans* faz parte do grupo de microrganismos comensais que colonizam esta mucosa.

Quando se analisou os dados referentes aos aspectos filogenéticos entre os isolados, observou-se que a maior diversidade genética foi encontrada no grupo de

isolados pertencentes à espécie *Candida albicans*. Os 80 isolados desta espécie foram divididos em 2 grupos populacionais distintos. Ainda foi constatado que a fonte do isolamento não influenciou na variabilidade genética.

Observou-se que o polimorfismo dos isolados deste estudo, pertencentes à espécie *Candida albicans*, assemelha-se às linhagens de referência e aos isolados obtidos em pesquisas de outras universidades brasileiras.

Na análise referente ao perfil de suscetibilidade *in vitro* ao fluconazol, observou-se que todos os isolados eram sensíveis (CIM < 8 µg/mL) a este antifúngico. Todavia, encontrou-se uma maior concentração inibitória mínima entre os isolados pertencentes à espécie *Candida glabrata* e, verificou-se que a maior média da CIM foi observada entre os isolados obtidos dos pacientes transplantados renais.

Os resultados do polimorfismo no gene *ERG11* entre os isolados apontaram 146 alterações mutagênicas, sendo 121 na espécie *C. albicans* e 25 na espécie *C. tropicalis*. Contudo, não foi observado polimorfismo entre os isolados de *C. glabrata*. Ainda, verificou-se que a maioria das mutações encontradas entre os isolados eram classificadas como sinônimas.

As mutações encontradas nos fragmentos do gene *ERG11* da espécie *C. albicans* foram identificadas como F105L, D116E, K119N, e S137L do tipo sinônimo e a mutação K128T de sentido trocado. Já na espécie *C. tropicalis* foram encontradas as mutações T224C e G263A, sendo estas do tipo sinônimo. Ainda, referente à disposição dos alelos das mutações de sentido trocado (K128T), observou-se que a maioria dos alelos apresentava-se em heterozigose.

Os polimorfismos encontrados em fragmentos do gene *ERG11*, dos isolados clínicos analisados neste estudo, mesmo os classificados como mutações de sentido trocado, não foram suficientemente significativos para alterar a conformação estrutural do sítio de ligação do fluconazol na enzima *Erg11p*, o que conseqüentemente não provocou perda suscetibilidade das linhagens analisadas.

Diante do exposto, o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência a drogas, como o observado no gene *ERG11*, é de suma importância, tendo em vista a escassez de drogas disponíveis para o tratamento e a crescente perda de suscetibilidade dos microrganismos aos antifúngicos.

REFERÊNCIAS

- AKINS, R. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Med Mycol.** v.43, p.285-318, 2005.
- ALEXANDER, J.W., BOYCE, S.T., et al. The process of microbial translocation. **Annals of Surgery.** v.212, p.496-510, 1990.
- ALP, S., SANCAK, B., et al. Influence of different susceptibility testing methods and media on determination of the relevant fluconazole minimum inhibitory concentrations for heavy trailing *Candida* isolates with low-high phenotype. **Mycoses.** v.53, n.6, p.475-80, 2010.
- AMOURI, I., SELLAMI, H., et al. Microsatellite analysis of *Candida* isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis. **J Med Microbiol.** v.61, n.8, p.1091-6, 2012.
- ARANA, D.M., NOMBELA, C., et al. Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes. **J Antimicrob Chemother.** v. 65, p.54–62, 2010.
- ARANCIA, S., SANDINI S., et al. Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in PCR methods for the identification of five medically important *Candida* species. **Molecular and Cellular Probes.** v.23, p.218-226, 2009.
- ASERSE, A.A., RÄSÄNEN, L.A., et al. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology,** v.35, p.120-131, 2012.
- ASMUNDSDOTTIR, L. R., ERLENDSDÓTTIR, H., et al. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. **Clin Infect Dis,** v. 47, n.1, p.17-24, 2008.
- AZOULAY, E., COHEN, Y., et al. Practices in nonneutropenic ICU patients with *Candida*-positive airway specimens. **Intensive Care Med.** v.30, n.7, p.1384-9, 2004.
- BARBEDO, L.S., SGARBI, D.B.G. Candidíases. **J Bras Doenças Sex Transm.** v.22, p.22-38, 2010.
- BELAZI, M., VELEGRAKI, A, et al. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. **Mycoses.** v.48, p.192–196, 2005.
- BEN-AMI, R., GARCIA-EFFRON, G., et al. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. **J Infect Dis.** v.204, n.4, p.626-35, 2011.

BENNETT, R.J. A *Candida*-based view of fungal sex and pathogenesis. **Genome Biol.** v.10, n.7, p. 230, 2009.

BIBASHI, E., MEMMOS, D., et al. Fungal peritonitis complicating peritoneal dialysis during an 11-year period: report of 46 cases. **Clin Infec Dis.** v.36, p.927-31, 2003.

BIZERRA, F.C., NAKAMURA, C.V, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res.** v.8, p. 442-50, 2008.

BOUGNOUX, M. E., DIOGO, D., et al. Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. **J. Clin. Microbiol.** v.44, p.1810–1820, 2006.

BUCKLEY, M. The fungal kingdom-diverse and essential roles in earth's ecosystem. A report based on a colloquium held November 2–4, 2007. **American Academy of Microbiology**, Washington, DC. 2008

BUTLER, G., RASMUSSEN, M.D., et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature.** v.459, p.657-662, 2009.

CALABRESE, D., BILLE, J., et al. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*FLU1*) conferring resistance to fluconazole. **Microbiology.** v.146, p.2743-54, 2000.

CALDERONE, R.A. ***Candida and Candidiasis***. Washington, DC: ASM Press. 2002.

CANNON, R. D., A. R. HOLMES, et al. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J. Dent. Res.** v.74, p. 1152–61, 1995.

CANNON, R.D., LAMPING, E., et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. **Microbiology.** v.153, p.3211–7, 2007.

CANNON, R.D., LAMPING, E., et al. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews.** vol. 22, p. 291–321, 2009.

CARMO, E. S., BELÉM, L.F., et al. Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital público em Campina Grande-PB. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 3, p. 213, 2007.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J., GIUSIANO, G., et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter.** v.19, n.2, p.130-9, 2006.

CARVALHO, V. O. **Identificação e análise de mutações no gene *ERG11* de isolados de *Candida* susceptíveis e resistentes ao fluconazol.** São Paulo. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pediatria, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

CHAPMAN, R.L., FAIX, R.G. Invasive neonatal candidiasis: an overview. **Semin Perinatol.** v.27, p.352-6, 2003.

CHAU, A.S., MENDRICK, C.A., et al. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. **Antimicrob Agents Chemother.** v.48, n.6, p.2124-31, 2004.

CHEN, C.G., YANG, Y.L., et al. Rep1p negatively regulating *MDR1* efflux pump involved in drug resistance in *Candida albicans*. **Fungal Genet Biol.** v.46, n.9, p.714-20, 2009.

CIARDO, D.E., SCHÄR, G., et al. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. **J Clin Microbiol.** v.44, p. 77-84, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. **CLSI**, Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A2. **CLSI**, Wayne, PA, USA, 2010.

COLEMAN, D.C., RINALDI, M.G., et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Med Mycol.** v.36, Suppl1, p.156-65, 1998.

COLOMBO A.L., NUCCI, M., et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide 165 sentinel surveillance of candidemias in eleven medical centers. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2816-23, 2006.

COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop.**v.36, p.599-607, 2003.

COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T., et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis: a joint meeting report of three medical societies – Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis.** v.16, Suppl.1, p:S1-S34, 2012.

COLOMBO, A.L., PERFECT, J., et al. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v.22, n.8, p.470-4, 2003.

COSTE, A., SELMECKI, A., et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. **Eukaryot Cell**. v.6, p.1889-1904, 2007.

DE HOOG, G.S., GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. **Mycoses**, v.41, p. 183-189, 1998.

D'ENFERT C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. **Curr Drug Targets**. v.7, p. 465-70, 2006.

DIEKEMA, D.J., MESSER, S.A., et al. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J Clin Microbiol**. v.40, n.4, p.1298-302, 2002.

DIGNANI, M.C., SOLOMKIN, J.S., et al. **Candida**. In: ANAISSIE, E., MCGINNIS, M.R., PFALLER, M.A. (eds) Medical Mycology. 1. Ed. Churchill Livingstone: Filadélfia, 2003. p. 195-239.

DU, W., COAKER, M., et al.. Shuttle vectors for *Candida albicans*: control of plasmid copy number and elevated expression of cloned genes. **Current Genetics**. v.45, p.390-398, 2004.

DUNKEL, N., LIU, T.T., et al. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. **Eukaryot Cell**. v.7, p.1180-90, 2008.

EINSELE, H., HEBART, H., et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. **J. Clin. Microbiol**. v.35, p.1353-60, 1997.

ENJALBERT, B., MACCALLUM, D.M., et al. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Infect Immun**. v. 75, p.2143–2151, 2007.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **International Journal of Organic Evolution**. v.39, p.366-369, 1985.

FERREIRA, A.S.A. **Infecções fúngicas – Diagnóstico e epidemiologia**. Dissertação Mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 2008.

FLORENT, M., NOEL, T., et al. Nonsense and missense mutations in FCY2 and FCY1 genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.53, p. 2982-90, 2009.

FORBES, B.A., SAHM, D. F., et al. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. Miosby. 2002.

- FORTE, N.W. **Imunologia básica e aplicada**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2004.
- GALLE, L., GIANINNI, M. Prevalência e suscetibilidade de leveduras vaginais. **J Bras Patol Med Lab**. v.40, n.4, p.229-36, 2004.
- GIRALDO, P., WITKIN, S. Vaginal candidiasis: an incomprehensible challenge. **I Bras Dis Sex Transm**. v.10, n.5, p. 31-6, 1998.
- GIRMENIA, C., PIZZARELLI, G., et al. *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. **J Clin Microbiol**. p.44, n.7, p.2458-64, 2006.
- GOKCE, G., CERIKCIOGLU, N. et al. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**. v.164, p.265–269, 2007.
- GOLDMAN, G., FERREIRA, M., et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.50, p.25–32, 2004.
- GOLUB, J.S., JOHNS, M.M.3rd. Esophageal candidiasis. **Ear Nose Throat J**.v.84, n.12, p,765, 2005.
- GONÇALVES, S.S., AMORIM, C.S., et al. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of *Candidaemia* in Brazil. **Clin Microbiol Infect**. v.16, n.7, p.885-7, 2010.
- GRKOVIC, S., BROWN, M.H., et al. Regulation of bacterial drug export systems. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**. v.66, p.671–701, 2002.
- GURBUZ, M., KALELI, I. Molecular analysis of *Candida albicans* isolates from clinical specimens. **Mycopathologia**. v.169, n.4, p.261-7, 2010.
- HALL, T.A. **BioEdit version 7.2.5**. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); Disponível em:<[http:// www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioDoc.pdf](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioDoc.pdf)> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 7/8/Vista/XP/2000/NT. 2013
- HAMMARSKJOLD, F., MERNELIUS, S., et al. Possible transmission of *Candida albicans* on an intensive care unit: genotype and temporal cluster analyses. **Journal Of Hospital Infection**. v.85, n.1, p.60-65, 2013.
- HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. **Clin Microbiol Rev**. v.8, p.462-78, 1995.
- HEERES, J., MEERPOEL, L., et al. Conazoles. **Molecules**.v.15, n.6, p.4129-88, 2010.

HILLER, E., ZAVREL, M., et al. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host-focus on the function of cell wall proteins. **Int J Med Microbiol.** v.301, n.5, p.384-9, 2011

HOF, H. Mycoses in the elderly. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 29, p. 5-13, 2010.

HOLANDA, A., FERNANDES, A., et al. Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura. **Femina.** v.33, n.5, p.347-51, 2005.

HOLMES, A.R., LIN, Y.H., et al. ABC transporter *CDR1p* contributes more than *CDR2p* does to fluconazole efflux in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother.** v.52, p.3851-62, 2008.

HSUEH, P.R., LAU, Y.J., et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan program data from 2003. **Antimicrob Agents Chemother.** v.49, p.512–517, 2005.

HUNG, C.C., YANG, Y.L., et al. Colonization of human immunodeficiency virus-infected outpatients in Taiwan with *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.** v.43, p.1600-03, 2005.

HUSAIN, S., TOLLEMAR, J., et al. Changes in the spectrum and risk factors for invasive candidiasis in liver transplant recipients: prospective, multicenter, case-controlled study. **Transplantation.** v.75, p. 2023-29, 2003.

INÁCIO, J., FLORES, O., et al. Efficient Identification of Clinically Relevant *Candida* Yeast Species by Use of an Assay Combining Panfungal Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification with Hybridization to Species-Specific Oligonucleotide Probes. **Journal of Clinical Microbiology.** v.46, p.713-720, 2008.

IWEN, P.C., HINRICHS, S.H., et al. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Med Mycol.** v.40, n.1, p.87-109, 2002.

IWEN, P.C., KELLY, D.M., et al. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. **Clin Infect Dis.** v.20, p342-7, 1995.

JACOBSEN, M.D., DAVIDSON, A.D., et al. Molecular phylogenetic analysis of *Candida tropicalis* isolates by multi-locus sequence typing. **Fungal Genetics and Biology.** v .45, p. 1040–42, 2008.

JIA, X.M., MA, Z.P., et al. *RTA2*, a novel gene involved in azole resistance in *Candida albicans*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.373, p.631-36, 2008.

KAPPE, R., MULLER, J. Rapid clearance of *Candida albicans* mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. **J. Clin. Microbiol.** v.29, p.1665-1669, 1998.

KARTHAUS, M., CORNELLY, O.A. Treatment options in Candidaemia. **Mycoses.** v.50, Suppl.1, p.44–49, 2007.

KAUFFMAN, C.A. CANDIDURIA. **Clin Infect Dis.** v.41,Suppl.6, p:S.371-6, 2005.

KELLY, S.L., LAMB, D.C., et al. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3,6diol. **Biochem Biophys Res Commun.** v.207, p.910-5, 1995.

KHOVIDHUNKIT, S.O., SUWANTUNTULA, T., et al. Xerostomia, hyposalivation, and oral microbiota in type 2 diabetic patients: A preliminary study. **J Med Assoc Thai.** v.92, n.9, p.1220-28, 2009.

KNUTSEN, A.K., ROBERT, V., et al. Polyphasic re-examination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida osloensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. and *Candida hollandica* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 57, p.2426 – 35, 2007.

KOLACZKOWSKI, M., KOLACZKOWSKA, A., et al. Substrates and modulators of the multidrug transporter *CDR1p* of *Candida albicans* in antifungal extracts of medicinal plants. **Mycoses.** v. 53, p. 305–310, 2009.

KOTHAVADE, R.J., KURA, M.M., et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazol. **Journal of Medical Microbiology.** v.59, p. 873–80, 2010.

KOUIDHI, B., BEN GAIED, M., et al. Les pompes à efflux en mycologie médicale mécanismes moléculaires et perspectives thérapeutiques. **Journal de Mycologie Médicale.** v. 20, p.304-314, 2010.

KRCMERY, V., BARNES, A.J. Non-*albicans* *Candida* spp. Causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J Hosp Infect.** v.50, p.243-60, 2002.

KUMAR, S., DUDLEY, J., et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics.** v.9, p.299-06, 2008.

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. **The yeasts:** a taxonomic study. New York: Elsevier Science, 1998.

LACAZ, C.S., PORTO, E., et al. **Tratado de Micologia Médica.** 9a. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

LAN, C. Y., NEWPORT, G., et al. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 99, p.14907–12, 2002.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics Applications Note.** v. 23, p.2947–48, 2007.

LEACH, M.D., STEAD, D.A., et al. Identification of sumoylation targets, combined with inactivation of *SMT3*, reveals the impact of sumoylation upon growth, morphology, and stress resistance in the pathogen *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell.** v.22, p. 687-702, 2011.

LEE, M.K., WILLIAMS, L.E. et al. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. **J Antimicrob Chemother.** v.53, p.217-24, 2004.

LEMKE, A., KIDERLEN, A.F., et al. Amphotericin B. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.68, p.151-62, 2005.

LEVIN, A.S., COSTA, S.F., et al. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semiimplantable central venous catheters and the hands of health care workers. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.30, p.243-91, 1998.

LOEFFLER, J., STEVENS, D.A. Antifungal drug resistance. **Clin. Infect. Dis.** v.36, Suppl.1, p.S31–S41, 2003.

LÖFFLER, J., KELLY, S.L., et al. Molecular analysis of *cyp51* from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. **FEMS Microbiol Lett.** v.151, n.2, p.263-8, 1997.

MACCALLUM, D.M., COSTE, A., et al. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. **Antimicrob Agents Chemother.** v.54, n.4, p.1476-83, 2010.

MANASTIR, L., ERGON, M. C et al. Investigation of mutations in *ERG11* gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. **Mycoses.** v.54,p. 99–04, 2011.

MANOHARLAL, R. **Differential regulation of multidrug resistance gene(s) in the clinical isolates of pathogenic yeast *Candida albicans*.** Phd Thesis. School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University. 2008.

MANOHARLAL, R., GORANTALA, J., et al. PAP1 [poly(A) polymerase 1] homozygosity and hyperadenylation are major determinants of increased mRNA stability of *CDR1* in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **Microbiology.** v.156, n.2, p.313-26, 2010.

MARICHAL, P., KOYMANS, L., et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (*Erg11p*, *Cyp51p*) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology.** v.145, p.2701-13, 1999.

MARIE, C., WHITE, T.C. Genetic basis of antifungal drug resistance. **Curr Fungal Infect Rep.** v.3, n.3, p.163–69, 2009.

MARR, K.A. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Med. Mycol.** v.46, p .293–02, 2008.

MARTENS, M., DELAERE, M., et al. Multilocus sequence analysis of *Ensiifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v.57, p.489-503, 2007.

MCMANUS, B.A., COLEMAN, D.C., et al. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.** v.46, p.652–64, 2008.

MENEZES, E.A., AUGUSTO, K.L., et al.. Frequência e atividade enzimática de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital de Fortaleza-CE. **J. Bras. Patol. Med. Lab,** v.43, n.4, p.241-44, 2007.

MOREIRA-OLIVEIRA, M.S., MIKAMI, Y., et al. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v.24, p.721-6, 2005.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology.** v.47, p.94–06, 2010.

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., et al. **Microbiologia Médica**, 5ª Ed. RJ,. Elsevier, 2006.

NACKLEY, A.G., SHABALINA, S.A., et al. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. **Science.** v.314, p.1930-3, 2006.

NAVAZESH, M., KUMAR, S.K. Measuring salivary flow Challenges and opportunities. **J. Am. Dent. Assoc.** v.139, Suppl.1, p.S35-S40, 2008.

NG, K. P., MADASAMY, M., et al. *Candida* biotypes isolated from clinical specimens in Malaysia. **Mycopathologia.** v.144, p.135–40, 1998.

NOUMI, E. Adhesive Properties and Hydrolytic Enzymes of Oral *Candida albicans* Strains. **Mycopathologia.** v.169, n.4 , p.269-78, 2010.

NUCCI M. Candiduria in hospitalized patients: a review. **Braz J Infect Dis.** v.4, p.168-72, 2000.

NUCCI, M., QUEIROZ-TELLES, F., et al Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis.** v.51, n.5, p.561-70, 2010.

NUNLEY, D.R., GAL, A.A., et al Saprophytic fungal infections and complications involving the bronchial anastomosis following human lung transplantation. **Chest.** v.122, p.1185-91, 2002.

OBRADOVIĆ, R.R., KESIĆ, L.G., et al. Diabetes Mellitus and Oral Candidiasis. **Acta Stomatologica Naissi.** v.27, n.63, p.1025-34, 2011.

ODDS, F.C., DAVIDSON, A.D., et al *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. **J. Clin. Microbiol.** v.44. p.3647–58, 2006.

ODDS, F.C., BROWN, A.J. et al. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol.** v.11, p.272–79, 2003.

ODDS, F.C., BROWN, A.J., et al. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. **Genome Biol.** v.5, p.230, 2004.

ODDS, F.C., JACOBSEN, M.D. Multilocus Sequence Typing of Pathogenic *Candida* Species. **Eukaryotic Cell.** v. 7, n. 7, p. 1075–84, 2008.

OROZCO, A.S., HIGGINBOTHAM, L.M., et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.42, p.2645- 49, 1998.

PAPPAS, P.G., REX, J.H., et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin. Infect. Dis.** v.38, p.161-89, 2004.

PASRIJA, R., BANERJEE, D., et al. Structure and function analysis of CaMDR1p, a major facilitator superfamily antifungal efflux transporter protein of *Candida albicans*: identification of amino acid residues critical for drug/H⁺ transport. **Eukaryot Cell.** v.6, p.443-53, 2007.

PEREA, S., LOPEZ-RIBOT, J.L., et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrob Agents Chemother.** v.45, p.2676-84, 2001.

PFALLER, M.A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. **Clin Infect Dis.** v.22, Suppl. 2, p.S89-94, 1996.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., et al. Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates

collected from 1997 through 1999 in the SENT RY antimicrobial surveillance program. **J Clin Microbiol.** v.39, p.3254-9, 2001.

PFALLER, M.A., MESSER, S.A., et al. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. **J Clin Microbiol.** v.42, n.7, p.3142-6, 2004.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol**, v. 20, n. 1, p.133-63, 2007.

PINJON, E., JACKSON, C.J., et al. Reduced azole susceptibility in genotype 3 *Candida dubliniensis* isolates associated with increased *CdCDR1* and *CdCDR2* expression. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.49, p.1312–18, 2005.

POSADA, D., CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics.** v.14, n.9, p.817-818, 1998.

PRASAD, N., GUPTA, A. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients. **Perit Dial Int.** v.25, n.3, p.207-22, 2005.

PRASAD, R., GAUR, N.A., et al. Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. **Infect Disord Drug Targets.** v.6, p.69-83, 2006.

QIAO, J., LIU, W., et al. Antifungal resistance mechanisms of *Aspergillus*. **Jpn.J.Med.Mycol.** v.49, n.3, p.157-63, 2008.

REISS, E., ODDS, O. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. **Medical Mycology.** v.36, p.249-57, 1998.

RIBEIRO, E.L., GUIMARÃES, R.I., et al. Aspectos das leveduras *Candida* vinculadas as infecções nasocomiais. **NewsLab.** v.3, n. 64, p.106-25, 2004.

RICHARDSON, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J Antimicrob Chemother**, v.56, p.5-11, 2005.

RODAKI, A., BOHOVYCH, I.M., et al. Glucose Promotes Stress Resistance in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell.** v. 20, p.4845–55, 2009.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J., CUESTA, I., et al. Pruebas moleculares em el diagnóstico micológico. **Enferm Infec Microbiol Clin.** v.26, p.47-53, 2008.

RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** v.19, p.1572-74, 2003.

ROY, B., MEYER, S.A. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol.** v.36, p.216-18, 1998.

RUHNKE, M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. **Curr Drug Targets.** v.7, p. 495–04, 2006.

SÁ-CORREIA, I., DOS SANTOS, S.C., et al. Drug:H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. **Trends Microbiol.** v.17, n.1, p.22-31, 2009.

SAMARANAYAKE, D.P., HANES, S.D. Milestones in *Candida albicans* gene manipulation. **Fungal Genetics and Biology.** v. 48, p. 858-65, 2011.

SAN-BLAS, G., CALDERONE, R.A. **Pathogenic Fungi** - Structural Biology and Taxonomy. Caister Academic Press, Inglaterra. 2004.

SANDVEN, P., QVIST, H., et al. Group and the Norwegian Yeast Study Group. Significance of *Candida* recovered from intraoperative specimens in patients with intra-abdominal perforations. **Crit Care Med.** v.30, n.3, p.541-7, 2002.

SANGER, F., NICKLEN, S., et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci.** v. 74, p.5463-7, 1977.

SANGLARD, D., ISCHER, F., et al. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. **Mol. Microbiol.** v.48, p.959–76, 2003.

SANGLARD D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. **Enferm Infec Microbiol Clin.** v.20, n.9, p.462-9, 2002.

SANGLARD, D., ODDS, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect Dis.** v.2, p.73-85, 2002

SANGLARD, D., ISCHER, F., et al. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother.** v.42, p.241-53, 1998.

SANGUINETTI, M., POSTERARO, B., et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.49, p.668-79, 2005.

SASHIKUMAR, R, KANNAN, R. Salivary glucose levels and oral *Candidal* carriage in type II diabetics. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.109, n.5, p.706-11, 2010.

SASSE, C., SCHILLIG, R., et al. Inducible and constitutive activation of two polymorphic promoter alleles of the *Candida albicans* multidrug efflux pump *MDR1*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.56, n.8, p.4490-4, 2012.

SCHUBERT, S., ROGERS, P.D., et al. Gain-of-Function Mutations in the Transcription Factor *MRR1* Are Responsible for Overexpression of the *MDR1* Efflux Pump in Fluconazole-Resistant *Candida dubliniensis* Strains. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** v.52, n.12, p.4274–80, 2008.

SEGAL, B.H., ALMYROUDIS, N.G., et al. Prevention and early treatment of invasive fungal infection in patients with cancer and neutropenia and in stem cell transplant recipients in the era of newer broad-spectrum antifungal agents and diagnostic adjuncts. **Clin. Infect. Dis.** v.44, p.402-9, 2007.

SELMECKI, A., FORCHE, A. et al. Aneuploidy And isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. **Science.** v.313, p.367–70, 2006.

SHIN, J.H., BOUGNOUX, M.E., et al. Genetic diversity among Korean *Candida albicans* bloodstream isolates: assessment by multilocus sequence typing and restriction endonuclease analysis of genomic DNA by use of BssHII. **J Clin Microbiol.** v.49, n.7, p.2572-7, 2011.

SILVA, J.O., COSTA, P.P., et al. Manutenção de leveduras por congelamento a –20°C. **Revista Brasileira Análises Clínicas.** v.40, n.1, p.73-4, 2008.

SILVA, Z.D.L. **Ocorrência, diagnóstico molecular e resistência a antifúngicos de *Candida* sp. de infecções vaginais em Portugal e Cabo-Verde.** Lisboa. Dissertação (Mestrado). Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. 2013.

SOBEL, J.D., FISHER, J.F., et al. *Candida* urinary tract infections-epidemiology. **Clin Infect Dis.** v.52, Suppl.6, p.S433-S6, 2011.

SOLL, D. R. Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. **Bioessays.** v. 26, p.10–20, 2004.

SOLL, D. R., PUJOL, C. *Candida albicans* clades. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.39, n.1, p.1–7, 2003.

SOUZA, E.A.F., ALMEIDA, L.M.M., et al. Frequência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. **An. Bras. Dermatol.** v.82, n.2, p. 151-6, 2007.

SUGITA, T., NISHIKAWA, A. Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.** v.45, p.55-8, 2004.

TAMURA, K., PETERSON, D., et al. MEGA.5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. v.28, p.2731-39, 2011.

TAVANTI, A., DAVISON, A.D., et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J Clin Microbiol**. v.43, p.284-92, 2005.

TAVANTI, A., GOW, N.A.R., et al. Genetic evidence for recombination in *Candida albicans* based on haplotype analysis. **Fungal Genet. Biol**. v.41, p. 553–62, 2004.

TAVERNA CG, BOSCO-BORGEAT ME, et al. Comparative analyses of classical phenotypic method and ribosomal RNA gene sequencing for identification of medically relevant *Candida* species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.108, p.178-85, 2013.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R. et al. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre. Artmed, 2012.

TREAGAN, L. **Candida and its role in opportunistic mycosis**. California Association for Medical Laboratory Technology. CAMLT. 2008.

VAN ASBECK, E., CLEMONS, K.V., et al. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.62, p.106-9, 2008.

VANDEN ABEELE, A., DE MEEL, H., et al. Denture contamination by yeasts in the elderly. **Gerodontology**. v.25, n.4, p.222-8, 2008.

VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., et al. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int J Microbiol**. ID. 713687, p.26, 2012.

VANDEPUTTE, P., LARCHER, G., et al. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.49, n.11, p.4608-15, 2005.

VAZQUEZ, J.A, SOBEL, J.D. Mucosal candidiasis. **Infect Dis Clin North Am** v.16, n. 4, p.793-820, 2002.

VAZQUEZ, J.A. Invasive oroesophageal candidiasis: current and developing treatment options. **Drugs**. v.63, n.10, p.971-89, 2003.

VILGALYS, R., HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **J. Bacteriol**. v. 172, n.8, p. 4238-46, 1990.

- VOGEL, M., HARTMANN, T., et al. Rifampicin induces *MDR1* expression in *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother.** v.61, n.3, p.541-7, 2008.
- WANG, G.S., COOPER, T.A. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. **Nat Rev Genet.** v.8, p.749–61, 2007.
- WANG, H., KONG, F., et al. Rapid detection of *ERG11* gene mutations in clinical *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing. **BMC Microbiol.** v.9, p.167, 2009.
- WARNOCK, D.W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.** v.48, n.1, p.1-12, 2007.
- WEERASURIYA, N., SNAPE, J. A study of *Candida* esophagitis in elderly patients attending a district general hospital in the UK. **Dis Esophagus.** v.19, n.3, p.189-92, 2006.
- WHITE, J.J.F., MORROW, A.C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia,** v.82, p.218-26, 1990.
- WHITE, T.C., HOLLEMAN, S., et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.46, p.1704–13, 2002.
- WILLEY, J.M., SHERWOOD, L.M. et al. **Prescott, Harley and Klein's Microbiology.** 7th ed. McGraw Hill. Boston. 2008.
- WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin Infect Dis.** v.20, p.115-25, 1995.
- WIRSCHING, S., MICHEL, S., et al. Activation of the multiple drug resistance gene *MDR1* in fluconazoleresistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. **J Bacteriol.** v.182, p.400-04, 2000.
- WU, W., PUJOL, C., et al. Chromosome loss followed by duplication is the major mechanism of spontaneous mating-type locus homozygosity in *Candida albicans*. **Genetics.** v.169, p.1311–27, 2005.
- WU, Y., ZHOU, H., et al. Analysis of the clonality of *Candida tropicalis* strains from a general hospital in Beijing using multilocus sequence typing. **PLoS One.** v. 7, n.11, p. 47767, 2012.
- XU, Y., CHEN, L., et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations. **J. Antimicrob. Chemother.** v.61, p.798-04, 2008.

YAN, L., ZHANG, J., et al. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**. v.40, n.12, p.1048-60, 2008.

YAN, L., LI, M., et al. The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.64, p.764–73, 2009.

ZALAR, P., NOVAK, M., et al. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. **Fungal Biology**. v.115, p.997-07, 2011.

ZHOU, H., LORENZ, M. C. Carnitine acetyltransferases are required for growth on non-fermentable carbon sources but not for pathogenesis in *Candida albicans*. **Microbiology**. v.154, p.500–9, 2008.

ZNAIDI, S., DE DEKEN, X., et al. The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates *PDR16* expression in *Candida albicans*. **Mol. Microbiol.** v.66, p.440-52, 2007.

ZNAIDI, S., BARKER, K.S., et al. Identification of the *Candida albicans* CAP1p regulon. **Eukaryot Cell**. v.8, n.6, p.806-20, 2009.

Apêndice

Apêndice 1 – Termo de aprovação do conselho de etica

	<p>UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93 Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (CEPEH)</p>	
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>Certificamos que o projeto "CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE LEVEDURAS CANDIDA ISOLADAS DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS", protocolo 21522/2012, sob a responsabilidade de VOLMIR PITT BENEDETTI, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Humana, adotados pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), e Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, tendo sido aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UNIPAR (CEPEH/UNIPAR) em reunião realizada em 30/09/2011. Este certificado expira em 30/09/2012.</p>		
<p>We certify that the project "CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE LEVEDURAS CANDIDA ISOLADAS DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS", protocol 21522/2012, in the responsibility of VOLMIR PITT BENEDETTI, is in agreement with the Ethical Principles of Human Experimentation, adopted by the National Council of Research Ethics (CONEP), and resolution 196/96 of the Ministry of Health, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR HUMAN RESEARCH OF UNIPAR (CEPEH/UNIPAR) in 09/30/2011. Expiration date: 09/30/2012.</p>		
<p>F.BELTRAO - PR, 08/04/2014.</p>		
 Prof. Msc. Nelson Anderson Bespalez Corrêa Presidente CEPEH/UNIPAR	 Thais Camilla Rodrigues Secretária CEPEH/UNIPAR	
<p>Registro Nº: 21522</p>		

Apêndice 2 – Ficha epidemiologica**FICHA EPIDEMIOLÓGICA****ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA COLONIZAÇÃO DAS LEVEDURAS DO
GÊNERO *CANDIDA* ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL
DE PACIENTE TRANSPLANTADO RENAL E DIABÉTICO**

- 1) Nome: _____ Prontuário: _____
- 2) Idade: _____
- 3) Sexo: () Feminino () Masculino
- 4) Já apresentou sintomas de candidíase bucal?
() Apenas uma vez
() Mais de uma vez
() Frequentemente
() Nunca apresentou
- 5) Esta sob uso de antiinflamatórios (corticóides)?
() Não () Sim Qual? _____
- 6) Esta sob uso de antibióticos?
() Não () Sim Qual? _____
- 7) Possui alguma doença crônica, como diabetes, hepatite ou é paciente transplantado?
() Não () Sim Qual? _____
- 8) Em caso de diabetes, quanto tempo possui a doença? Anos _____
- 9) Em caso de Transplantado renal: Quanto tempo realizou o transplante:
Anos _____

Apêndice 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Esta pesquisa possui como objetivo fazer um epidemiológico do nível de colonização por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de pacientes imunocomprometidos. Esta pesquisa é intitulada de “**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA COLONIZAÇÃO DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA* ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES TRANSPLANTADO RENA E DIABÉTICOS**”.

Caso você participe da pesquisa, será coletada saliva de sua cavidade bucal a coleta de material não oferece danos à sua saúde. A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo ou, se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento, ainda não será lhe cobrado nenhum valor, sendo este de responsabilidade do pesquisador.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo ao qual fui convidado a participar. Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa.

Assinatura do Paciente ou Responsável / CPF

Local: **Francisco Beltrão** Data ___ / ___ / _____

Anexo 1 – Metodologia

Seleção do grupo de estudo

Nesta pesquisa foram analisadas 120 leveduras do gênero *Candida*, isoladas da saliva de 190 indivíduos, dos quais 64 eram pacientes diabéticos, 37 transplantados renais e 89 pacientes sem déficit imunológico (grupo controle) e 3 linhagens de referência de *Candida* da *American Type Culture Collection* (ATCC), das espécies *Candida albicans* ATCC - 44858, *Candida glabrata* ATCC - 2001 e *Candida tropicalis* ATCC – 28707. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - CEPEH da Universidade Paranaense (UNIPAR), sob protocolo 19885. (Apêndice 1)

Entrevista com os pacientes

Antecedendo a coleta do material biológico foi executada uma entrevista com os pacientes, preenchendo-se uma ficha epidemiológica, que abordava questões referentes ao nome, idade e gênero e perguntava se o paciente já havia apresentado sintomas de candidíase bucal. Também foram pesquisadas informações sobre o uso de medicamentos com anti-inflamatórios (corticosteróides) ou antibióticos. O conteúdo completo desta ficha epidemiológica está no apêndice 2.

Coleta das amostras biológicas

Antes da coleta das amostras biológicas, orientaram-se os pacientes a não ingerirem alimentos, bebidas, fumo ou goma de mascar, por um período de uma hora antecedendo a coleta. Foi recomendado que executassem o bochecho com água potável por cinco segundos, por três vezes. Em seguida aconselhou-se a não deglutirem a saliva por um período de três minutos, de modo a estimular a salivação. Após estes procedimentos, os pacientes depositaram o conteúdo salivar no interior do tubo devidamente esterilizado e identificado. As amostras que apresentavam alto grau de viscosidade foram diluídas em soro fisiológico estéril a 0,9%, na proporção de 1:2 (Navazesh, Kumar, 2008).

Isolamento e identificação das leveduras

Foram semeados 100 µL do material clínico de cada paciente, por técnica de contagem de colônia em placas de petri, contendo meio seletivo diferencial CHROagar[®] (Becton–Dickinson) e incubado a 25°C por 5 dias. Em seguida, foi feita a determinação da unidade formadora de colônia de cada amostra e a identificação presuntiva das espécies por métodos convencionais, como provas bioquímicas de assimilação (auxonograma), fermentação de açúcares (zimograma), produção de tubo germinativo e micromorfologia em ágar fubá suplementado com tween 80 (Kurtzman, Fell, 1998).

Armazenamento das amostras

Para estocagem das leveduras executou-se um repique em Ágar Sabouraud Dextrose (Difco[®]) por 48 horas. Em seguida as amostras foram semeadas em caldo de *infusão de cérebro-coração* (*Brain Heart Infusion* - BHI, Difco[®]) com 20% de glicerol, previamente distribuídos em tubos modelo Eppendorf[®] contendo miçangas. Na sequência, incubou-se a 30°C por 48 horas. Após este período os tubos foram colocados sob refrigeração a temperatura de 8°C durante 7 dias. Decorrido este tempo, armazenou-se as amostras de leveduras em freezer a - 20°C. Para a revitalização das amostras congeladas, repicaram-se as leveduras em Ágar Sabouraud Dextrose (Difco[®]) por 24 horas a 35°C (Silva *et al.*, 2008).

Linhagens de referência

Para este estudo, juntamente com as leveduras isoladas das amostras clínicas dos 190 pacientes, foram utilizadas linhagens de referência de *Candida* da *American Type Culture Collection* (ATCC), com padrão conhecido de suscetibilidade ao fluconazol, das espécies *Candida albicans* ATCC – 44858 (CIM - 1 µg/mL), *Candida glabrata* ATCC – 2001 (CIM - 4 µg/mL) e *Candida tropicalis* ATCC - 28707 (CIM - 2 µg/mL), que serviram como padrão de referência para os testes de determinação do concentração inibitória mínima (CIM) para o antifúngico fluconazol.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima ao antifúngico fluconazol

A avaliação da suscetibilidade das leveduras com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ao fluconazol foi realizada utilizando o E-test (Biomérieux®) em ágar Mueller-Hinton (Difco®) suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno, de acordo com o documento M44-A2, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Os critérios utilizados para classificação dos padrões de suscetibilidade seguiu o documento M27-A3, no qual as leveduras do gênero *Candida* são classificadas como suscetíveis ao fluconazol para valores da CIM igual ou inferior a 8 µg/mL, suscetibilidade dose-dependente para valores de CIM entre 16 e 32 µg/mL, e resistente quando a concentração inibitória mínima que inibe o crescimento for igual ou superior a 64 µg/mL (CLSI, 2008).

Extração de DNA de *Candida*

O DNA genômico foi extraído a partir de uma suspensão de colônias de leveduras, contendo aproximadamente 10^6 células/mL, que foram cultivadas em meio ágar batata-dextrose incubado a 25°C por 5 dias. Aproximadamente 1000 µL desta suspensão foi colocado em tubo do tipo Eppendorf de 2mL utilizados para a extração de DNA. A partir deste momento, foi utilizado o protocolo de extração do fabricante do Kit *Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit* (MoBio®). Para verificar a integridade do DNA extraído, executou-se a eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v em TBE1x), utilizando 5 µL do padrão de peso molecular (DNA do fago λ clivado com a enzima Hind III - Invitrogen®), corado com GelRed®. Os resultados foram registrados em sistema de foto documentação com transiluminador de luz Ultravioleta (UV). O DNA foi quantificado utilizando o equipamento NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) e posteriormente, quando necessário, foi diluído com água ultrapura para obter uma concentração de aproximadamente 10 ng/µL.

Identificação molecular das espécies de *Candida*

Para a identificação molecular dos isolados de *Candida*, foi utilizada a metodologia de amplificação pela reação do PCR dos fragmentos da região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do DNA ribossomal de cepas de *C. albicans*, *C.*

tropicalis, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* isoladas de amostras clínicas. Utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores (primers) V9G (De Hoog e Gerrits Van Den Ende, 1998), ITS4 (White e Morrow, 1990), universais para fungos, que amplificam fragmentos do ITS1 e ITS2 da região 5,8S do DNA ribossomal, como descrito por Knutsen *et al.* (2007), e os primers LR5 e LR05 que amplificam fragmentos do gene 28s do rDNA (Vilgalys, Hester, 1990) (Quadro 1).

Quadro 1 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 e do gene 28S do DNA ribossomal de leveduras do gênero *Candida*.

Primer	Sequência	Referência
V9G	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'	Hoog e Gerrits Van den Ende, 1998
ITS 4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	White e Morrow, 1990
LR0R	5' ACCCGCTGAACTTAAGC 3'	Vilgalys e Hester, 1990
LR5	5' ATCCTGAGGGAACTTC 3'	Vilgalys e Hester, 1990

Reação de PCR para amplificar da região ITS1-5.8S-ITS2 e gene 28S do rDNA

O produto da extração do DNA genômico foi submetido a amplificação pela reação (PCR), onde a concentração dos componentes foi assim definida: Cada reação possuía um volume total de 25 µL, que continham deoxinucleotídeo trifosfato – dNTPs (300 mM), tampão de PCR 1x (Tris-base 20 mM, pH 8.4 e KCl 50 mM), 1,6 mM de MgCl₂, *primers* V9G e ITS4 (quadro 1) (15 pmol de cada), Taq DNA polimerase (0,8 U), e DNA (20 ng). A reação foi realizada em Termociclador (Labnet), de acordo com o protocolo descrito a seguir: uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto a 72°C, e concluindo com uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Após a confirmação da identificação das espécies do gênero *Candida* pela PCR, os 120 isolados mais as 3 linhagens de ATCC foram submetidos a uma nova amplificação utilizando os *primers* LR0R e LR5 (Quadro 1), empregando-se os mesmos componentes de reação e as respectivas concentrações como descrito acima. A reação foi realizada em Termociclador (Labnet), de acordo com o protocolo

descrito a seguir: uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 48°C e 1 minuto a 72°C, e concluindo com uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Reação de PCR para os fragmentos do gene *ERG11*

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação de fragmentos do gene *ERG11* da espécie de levedura *Candida albicans* foram descritos por Xu *et al* (2008) (GB-2503). Os outros primers que foram utilizados neste estudo, para as espécies de *Candida tropicalis* (GB-61189833) e *Candida glabrata* (GB-159461713), foram obtidos e estão depositados no GenBank (GB). O primers utilizados neste estudo amplificam fragmentos de 407 a 482 pares de bases de uma região do gene *ERG11* (Quadro 2).

Quadro 2 – Primers que amplificam fragmentos do gene *ERG11* de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*.

Espécie	Gene	Primer	Região amplificada	Tamanho do fragmento
<i>C. albicans</i> (GenBank-X13296) Xu et al., 2008	1851 pb	ERGSec1A (5'-TTAGTGTTTTATTGGATTCCCTTGGTT-3') ERGSec1B (5'-TCTCATTTTCATCACCAAATAAAGATC-3')	295 a 777 pb	482 pb
<i>C. glabrata</i> (GenBank-159461713)	2669 pb	CgERGr1-F:(5' – ACTACAATAACATGTCCACTGA - 3') CgERGr1-R:(5' – GGGTGGTCAAGTGGGAGTAA - 3')	550 a 957 pb	407 pb
<i>C. tropicalis</i> (GenBank-61189833)	2446 pb	CtERGr1-F:(5'- TCTTTTGTCAACACAGTAATGGC-3') CtERGr1-R:(5'– AACACCTTTACCAAAAACAGGAG-3')	500 a 907 pb	407 pb

As condições da reação da PCR de fragmentos do gene ERG 11 foram assim definidas: Cada reação possuía um volume total de 25 µL solução, em água ultrapura contendo 2,5 µL de tampão 10X para PCR, 1,6 mM de MgCl₂, 0,3 mM de uma mistura de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 20 ng de DNA extraído e 0,8 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Para a determinação de qual temperatura era a mais eficiente a ser utilizada na reação de amplificação, realizou-se um gradiente de temperatura entre 58°C a 65°C e, para cada espécie, utilizou-se uma temperatura diferente. A reação de amplificação para a espécie *Candida albicans* foi realizada em Termociclador (Labnet®), de acordo com o protocolo descrito a seguir: uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a

95°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C e, concluindo, com uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C. A reação de amplificação para a espécie *Candida tropicalis* utilizou o seguinte protocolo: etapa inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 64°C e 1 minuto a 72°C, e concluindo com a etapa final de 5 minutos a 72°C. Já o protocolo utilizado para a espécie *Candida glabrata* foi de: etapa inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 62°C e 1 minuto a 72°C e, concluindo com a etapa final de 5 minutos a 72°C.

Eletroforese

Os produtos resultantes da amplificação pela reação de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% (p/v em TBE1x). A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal modelo DGV10 (Prolab[®]), na qual utilizou-se uma voltagem de (3V/cm), por um período de 120 minutos. Foi utilizado o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen[®], California, USA), de 100 bp e corado com GelRed[®]. Os resultados foram visualizados em um transiluminador com luz ultravioleta. Para a foto documentação foi utilizado o programa UVP Bio-Imaging Systems (2003 Labworks v4.6 Image Acquisition and analysis software. Upland, EUA).

Purificação dos produtos amplificados por PCR

Para purificação dos produtos de PCR de uma reação de 23 µL, foi utilizado 15 µl de acetato de amônia (7,5M) e 74 µL de álcool etílico PA, em um Eppendorf, sendo, em seguida, deixado no gelo por 1 hora. Após este período centrifugou-se o tubo por 45 minutos a 12000 RPM. Ao final da centrifugação descartou-se o sobrenadante tendo o cuidado de não pipetar ou ressuspender o pellet. Em seguida acrescentou-se 100 µL de álcool etílico 70%, centrifugando novamente o Eppendorf por 10 minutos a 12000 RPM, em seguida descartou o sobrenadante com o cuidado de não dissolver o *pellet*. Após este procedimento, deixou-se o tubo secando por 12 horas e, em seguida, após o período de secagem o *pellet* foi ressuspensionado com 12 µl de água MiliQ.

Sequenciamento de fragmentos das regiões ITS1, gene 5.8S, ITS2, gene 28S do rDNA e fragmentos do gene *ERG11*

Os produtos das ampliações dos produtos do PCR foram sequenciados pelo método de terminação da cadeia segundo Sanger *et al.* (1977) seguindo o protocolo do Kit Big Dye (Amersham Biosciences[®]), o qual estipula a utilização de 50 ng do produto de PCR purificado, 0,25 µM de *primer*, 2 µl da mistura para sequenciamento ET (kit: DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE da Amersham Biosciences[®]) e água ultrapura para completar o volume final de 10 µl. As mesmas condições da reação de sequenciamento foram utilizadas para todos os *primers*, com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94° C, 15 segundos a 50° C e 1 minuto a 60°C. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados com Sephadex[™] G-50 *Fine DNA Grade*, e submetidas à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE (Amersham Biosciences[®]).

Análise Filogenética

As sequências obtidas neste estudo, tanto das regiões ITS1, gene 5.8S, ITS2 e gene 28s do rDNA como de fragmentos do gene *ERG11* foram alinhadas com sequências de referência adquiridas no banco de dados GenBank. Para o alinhamento e edição das sequências utilizou-se o programa MEGA 5.1 (Kumar *et al.*, 2008) e posterior observação visual, através do programa BioEdit 7.2.5 (Hall, 2013). Na análise de máxima verossimilhança utilizou-se o software GARLI (<http://www.molecularevolution.org>) e a inferência Bayesiana foi realizada através do software MrBayes v.3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2003). Para verificar a consistências dos nós utilizou-se o procedimento de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 2000 reamostragens. Nas análises fundamentadas em máxima verossimilhança e inferência Bayesiana, o software ModelTest versão 3.7 (Posada, Crandall, 1998) foi utilizado para fazer as comparações entre os diferentes modelos evolutivos. Na análise estatística foi desenvolvida a comparação das médias através de uma análise de variância (ANOVA) com uma significância de 0,05, quando o valor crítico apresentado se mostrou maior que o tabelado confirmou-se as diferenças com o Teste *t*.

Anexo 2 – Relação dos isolados de *Candida* spp identificando a espécie, o local de isolamento, a origem e o código de acesso no GenBank.

Linhagem	Código	Local do isolamento	Origem	GenBank	
				ITS1/ 5.8S/ ITS2	28S
<i>C. albicans</i>	CA_2_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361747	KM464557
<i>C. albicans</i>	CA_6_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361748	KM464558
<i>C. albicans</i>	CA_9_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361749	KM464559
<i>C. albicans</i>	CA_12_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361750	KM464560
<i>C. albicans</i>	CA_13_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361751	KM464561
<i>C. albicans</i>	CA_107_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361805	KM464615
<i>C. albicans</i>	CA_108_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361806	KM464616
<i>C. albicans</i>	CA_110_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361807	KM464617
<i>C. albicans</i>	CA_112_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361808	KM464618
<i>C. albicans</i>	CA_115_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361809	KM464619
<i>C. albicans</i>	CA_116_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361810	KM464620
<i>C. albicans</i>	CA_118_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361811	KM464621
<i>C. albicans</i>	CA_119_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361812	KM464622
<i>C. albicans</i>	CA_120_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361813	KM464623
<i>C. albicans</i>	CA_121_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361814	KM464624
<i>C. albicans</i>	CA_122_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361815	KM464625
<i>C. albicans</i>	CA_124_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361816	KM464626
<i>C. albicans</i>	CA_125_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361817	KM464627
<i>C. albicans</i>	CA_126_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361818	KM464628
<i>C. albicans</i>	CA_135_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361819	KM464629
<i>C. albicans</i>	CA_136_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361820	KM464630
<i>C. albicans</i>	CA_137_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361821	KM464631
<i>C. albicans</i>	CA_139_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361822	KM464632
<i>C. albicans</i>	CA_140_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361823	KM464633
<i>C. albicans</i>	CA_141_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361824	KM464634
<i>C. albicans</i>	CA_154_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361825	KM464635
<i>C. albicans</i>	CA_19_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361752	KM464562
<i>C. albicans</i>	CA_21_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361753	KM464563
<i>C. albicans</i>	CA_22_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361754	KM464564
<i>C. albicans</i>	CA_25_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361755	KM464565
<i>C. albicans</i>	CA_26_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361756	KM464566
<i>C. albicans</i>	CA_28_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361757	KM464567
<i>C. albicans</i>	CA_29_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361758	KM464568
<i>C. albicans</i>	CA_30_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361759	KM464569
<i>C. albicans</i>	CA_31_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361760	KM464570
<i>C. albicans</i>	CA_32_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361761	KM464571
<i>C. albicans</i>	CA_33_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361762	KM464572
<i>C. albicans</i>	CA_35_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361763	KM464573
<i>C. albicans</i>	CA_38_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361764	KM464574
<i>C. albicans</i>	CA_39_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361765	KM464575
<i>C. albicans</i>	CA_43_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361766	KM464576
<i>C. albicans</i>	CA_69_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361782	KM464592
<i>C. albicans</i>	CA_70_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361783	KM464593
<i>C. albicans</i>	CA_71_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361784	KM464594
<i>C. albicans</i>	CA_72_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361785	KM464595
<i>C. albicans</i>	CA_73_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361786	KM464596

<i>C. albicans</i>	CA_76_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361787	KM464597
<i>C. albicans</i>	CA_79_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361788	KM464598
<i>C. albicans</i>	CA_81_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361789	KM464599
<i>C. albicans</i>	CA_84_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361790	KM464600
<i>C. albicans</i>	CA_85_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361791	KM464601
<i>C. albicans</i>	CA_86_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361792	KM464602
<i>C. albicans</i>	CA_87_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361793	KM464603
<i>C. albicans</i>	CA_90_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361794	KM464604
<i>C. albicans</i>	CA_91_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361795	KM464605
<i>C. albicans</i>	CA_92_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361796	KM464606
<i>C. albicans</i>	CA_93_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361797	KM464607
<i>C. albicans</i>	CA_95_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361798	KM464608
<i>C. albicans</i>	CA_96_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361799	KM464609
<i>C. albicans</i>	CA_98_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361800	KM464610
<i>C. albicans</i>	CA_99_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361801	KM464611
<i>C. albicans</i>	CA_100_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361802	KM464612
<i>C. albicans</i>	CA_102_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361803	KM464613
<i>C. albicans</i>	CA_104_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361804	KM464614
<i>C. albicans</i>	CA_46_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361767	KM464577
<i>C. albicans</i>	CA_47_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361768	KM464578
<i>C. albicans</i>	CA_49_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361769	KM464579
<i>C. albicans</i>	CA_51_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361770	KM464580
<i>C. albicans</i>	CA_52_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361771	KM464581
<i>C. albicans</i>	CA_54_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361772	KM464582
<i>C. albicans</i>	CA_57_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361773	KM464583
<i>C. albicans</i>	CA_58_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361774	KM464584
<i>C. albicans</i>	CA_59_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361775	KM464585
<i>C. albicans</i>	CA_61_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361776	KM464586
<i>C. albicans</i>	CA_62_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361777	KM464587
<i>C. albicans</i>	CA_63_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361778	KM464588
<i>C. albicans</i>	CA_66_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361779	KM464589
<i>C. albicans</i>	CA_67_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361780	KM464590
<i>C. albicans</i>	CA_68_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361781	KM464591
<i>C. albicans</i>	HC04IC	Vagina	UFPR	KJ651886	-
<i>C. albicans</i>	ICB945	-	USP	JX463265	-
<i>C. albicans</i>	CA1150	Sangue	UFC	AB861482	-
<i>C. albicans</i>	CA70	Sangue	UNICAMP	DQ141236	-
<i>C. albicans</i>	CA15	Peritônio	UNESP	KF385990	-
<i>C. albicans</i>	LEMI7986E	Sangue	UNIFESP	KC905077	-
<i>C. albicans</i>	L8278	Sangue	UNIFESP	KC408953	-

<i>C. albicans</i>	CBS562	Pele	CBS	NR125332	-
<i>C. albicans</i>	44858	Língua de papagaio	ATCC	KM361826	KM464636
<i>C. dubliniensis</i>	CD_114_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361864	KM464638
<i>C. dubliniensis</i>	CD_117_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361865	KM464639
<i>C. dubliniensis</i>	CD_127_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361866	KM464640
<i>C. dubliniensis</i>	CD_75_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361863	KM464637
<i>C. tropicalis</i>	CT_40_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361827	KM464647
<i>C. tropicalis</i>	CT_42_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361828	KM464648
<i>C. tropicalis</i>	CT_77_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361831	KM464651
<i>C. tropicalis</i>	CT_105_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361832	KM464652
<i>C. tropicalis</i>	CT_106_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361833	KM464653
<i>C. tropicalis</i>	CT_55_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361829	KM464649
<i>C. tropicalis</i>	CT_65_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361830	KM464650
<i>C. tropicalis</i>	28707	Urina	ATCC	KM361834	KM464654
<i>C. glabrata</i>	CG_113_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361860	KM464644
<i>C. glabrata</i>	CG_123_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361861	KM464645
<i>C. glabrata</i>	CG_78_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361859	KM464643
<i>C. glabrata</i>	CG_45_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361857	KM464641
<i>C. glabrata</i>	CG_48_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361858	KM464642
<i>C. glabrata</i>	2001	Fezes	ATCC	JQ070075	KM464646
<i>C. parapsilosis</i>	CP_8_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361840	KM464655
<i>C. parapsilosis</i>	CP_11_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361841	KM464656
<i>C. parapsilosis</i>	CP_14_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361842	KM464657
<i>C. parapsilosis</i>	CP_109_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361854	KM464669
<i>C. parapsilosis</i>	CP_133_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361855	KM464670
<i>C. parapsilosis</i>	CP_138_PC	Boca- paciente controle	UFPR	KM361856	KM464671
<i>C. parapsilosis</i>	CP_18_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361843	KM464658
<i>C. parapsilosis</i>	CP_20_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361844	KM464659
<i>C. parapsilosis</i>	CP_24_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361845	KM464660
<i>C. parapsilosis</i>	CP_34_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361846	KM464661
<i>C. parapsilosis</i>	CP_36_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361847	KM464662
<i>C. parapsilosis</i>	CP_41_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361848	KM464663
<i>C. parapsilosis</i>	CP_44_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361849	KM464664
<i>C. parapsilosis</i>	CP_83_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361851	KM464666
<i>C. parapsilosis</i>	CP_88_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361852	KM464667
<i>C. parapsilosis</i>	CP_89_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361853	KM464668
<i>C. parapsilosis</i>	CP_56_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361850	KM464665
<i>C. metapsilosis</i>	CM_74_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361836	KM464673
<i>C. metapsilosis</i>	CM_82_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361837	KM464674
<i>C. metapsilosis</i>	CM_64_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361835	KM464672
<i>C. orthopsilosis</i>	CO_80_PD	Boca- paciente diabético	UFPR	KM361838	KM464675
<i>C. orthopsilosis</i>	CO_134_PT	Boca- paciente transplantado	UFPR	KM361839	KM464676