Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Adolfo José da Mota

Validação de uma metodologia molecular para identificação de fungos e investigação *in vitro* da transição dimórfica em *Candida albicans*.

Validation of a molecular method for identification of fungi and *in vitro* investigation of the dimorphic transition in *Candida albicans*

São Paulo
2012

Adolfo José da Mota

Validação de uma metodologia molecular para identificação de fungos e investigação *in vitro* da transição dimórfica em *Candida albicans*.

Validation of a molecular method for identification of fungi and *in vitro* investigation of the dimorphic transition in *Candida albicans*

Tese corrigida apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências Biológicas, na Área de Biologia/ Genética.

Orientador: Francisco Gorgônio da Nóbrega

Co-Orientador: Luis Eduardo Soares Netto

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Mota, Adolfo José

“Validação de uma metodologia molecular para identificação de fungos e investigação *in vitro* da transição dimórfica em *Candida albicans*”

187 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Candida* spp. 2. PCR-RFLP. 3. Transição dimórfica. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Eduardo Gorab
Prof(a). Dr(a).

Marcelo Afonso Vallim
Prof(a). Dr(a).

Valderez Gambale
Prof(a). Dr(a).

Oswaldo Keith Okamoto
Prof(a). Dr(a).

Francisco Gorgônio da Nóbrea
Prof(a). Dr(a).
Orientador(a)

The clock of life is wound but once,
And no man has the power
To tell just when the hands will stop
At late or early hour.

To lose one's wealth is sad indeed,
To lose one's health is more,
To lose one's soul is such a loss
That no man can restore.

The present only is our own,
So Live, Love, toil with a will
Place no faith in "Tomorrow"
For the clock may then be still.

Robert H. Smith

Agradecimentos

Um muito obrigado à minha família, em especial minha esposa Simone e filha Larissa, pela paciência e dedicação. Um abraço ao meu pai Olivério, amigo leal que muito tem me ajudado, sempre solícito e disposto ao diálogo.

Agradeço aos amigos que estão sempre dando uma força, e àqueles do Laboratório de Genética Molecular e Genomas que hoje estão em outros cantos, em especial à Namy Takahashi e Simone Bandeira, que muito me ensinaram.

Muito obrigado aos colaboradores Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito e Graziella Nuernberg Back-Brito (UNESP); Marilene Damasi (Butantã); e Sônia Khouri (UNIVAP) pela valiosa ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Obrigado ao Prof. Luis Netto por ter aceitado Co-orientar esse projeto e ainda facilitar que membros de sua equipe como a Simone Vidigal me ajudasse no desenvolvimento da parte de expressão e purificação de proteínas, bem como as etapas iniciais do fracionamento do soro fetal bovino.

Obrigado ao Prof. Carlos Taborda e ao Julian Esteban do ICB USP pela força com o ensaio ELISA. Ao pessoal da secretaria da Pós-Graduação, em especial à Érika sempre disposta a realmente “aliviar a aflição dos escravos da pós”. Muito obrigado também à Deisy da secretaria do departamento.

Muito obrigado ao sempre presente Luciano Bernardes, disposto a ajudar no emaranhado incognoscível da bioinformática

Um abraço especial à Dra. Marina Nóbrega, e um agradecimento especial ao “chefe”, Dr. Nóbrega. Professor, aprendi muito com o senhor e espero um dia poder fazer por alguém ou para alguns o que o senhor fez e tem feito por mim.

Agradeço também ao Dr. Bento Soares que abriu as portas de seu laboratório em Chicago para um estágio de três meses, fato que enriqueceu minha formação. O agradecimento se estende a toda sua equipe que me recebeu muito bem.

Muito obrigado à FAPESP e ao CNPq por terem financiado minha bolsa de estudo e o projeto.

Abreviaturas

ACT1	Gene da actina 1
AD	Água destilada
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALS	Genes da família <i>agglutinin-like sequence</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BME	2-mercaptoetanol
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
cDNA	DNA complementar
CIM	Concentração inibitória mínima
CPH1	Gene regulador da formação de pseudo-hifa em <i>Candida</i>
CZF1	Gene <i>Candida zinc finger</i>
C _T	<i>Cycle threshold</i> . Ciclo no qual a fluorescência da reação cruza um Limite virtual.
DDBJ	Banco de dados de sequencias, Japão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetil sulfoxido
ECE1	Gene: <i>Extent Cell Elongation 1</i>
EFG1	Gene regulador da formação de hifa em <i>Candida</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EMBL	Banco de dados de sequencias, Europa
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	grama, unidade de massa (Subunidades, mg, µg, ng)
<i>g</i>	aceleração gravitacional
GenBank	Banco de dados de sequencias EUA
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMM	Hidden Markov Models
HSL	Homoserina lactona
HWP1	Gene: hyphal wall protein 1
ITS	Espaçador interno transcrito
KDa	Kilodalton
KOAc	Acetato de potássio
L	Litro, unidade de capacidade (subunidades, mL, µL, nL)
LSC2	Gene da succinil-CoA sintetase
M	Molar ou mol por litro (subunidades, mM, µM, nM)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MGB	Minor groove binder (Sondas marcada com um <i>quencher</i> Modificado na extremidade 3')
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NaOAc	Acetato de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTC	Controle da reação de PCR sem DNA
NFQ	<i>Quencher</i> não fluorescente
NaOAc	Acetato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDNA	DNA plasmidial
PGN	peptídeoglicano
pH	Potencial hidrogeniônico

q.s.p	Quantidade suficiente para.
qPCR	PRC quantitativa
RBT	Genes que são regulados por TUP1
RAPD	Amplificação randômica do DNA polimórfico
rDNA	DNA do cistron ribossomal
RIP	Gene da ubiquinol citocromo-c redutase
RFLP	Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição
Rn	Reporter normalizado
RNA	Ácido ribonucléico
ROX	Referência da fluorescência interna da reação
RPM	Rotações por minuto
RPP2B	Gene da proteína ácida ribossomal
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da PCR
SBN	Sobrenadante
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal Bovino
TAMRA	Quencher fluorescente tetramethylrhodamine
TE	Solução diluída de Tris-Cl, EDTA
TBE	Tris-Cl, ácido bórico, EDTA
UV	Luz ultravioleta
VC	Volume da coluna
w/v	razão peso/volume (relaciona massa e capacidade)

Resumo

Validação de uma metodologia molecular para identificação de fungos e investigação *in vitro* da transição dimórfica em *Candida albicans*.

A classificação de fungos microscópicos é limitada pela escassez de detalhes morfológicos e incertezas na caracterização bioquímica. Nesse trabalho desenvolvemos um método simples, baseado na amplificação de um segmento de cerca de 2.800 pares de bases seguida de digestão com *DdeI* e análise do padrão após eletroforese em agarose. Demonstramos que o método discrimina tão bem quanto a sequência de DNA do segmento após analisar mais de 400 amostras que foram classificadas em 33 espécies. Essa tecnologia facilita a busca por novos representantes da imensa diversidade existente, espécies que podem ser exploradas quanto ao seu valor potencial para a medicina e a indústria. Outras metodologias moleculares foram desenvolvidas para discriminar entre espécies próximas e na identificação de novas espécies. Em seguida, o trabalho esteve voltado para o desenvolvimento de um ensaio laboratorial que nos permitisse estudar a transição dimórfica em *Candida albicans*. Desenvolvemos dois novos ensaios, um biológico e outro sobre membrana artificial, para estudar a indução ou inibição da produção de hifas. A expressão de genes associados ao processo foi acompanhada de maneira quantitativa. Fracionando cromatograficamente o soro fetal bovino, obtivemos resultados indicativos de frações estimuladoras e inibidoras da transição morfológica.

Palavras-chave. *Candida* spp.; identificação por PCR-RFLP; fatores de virulência; fracionamento do SFB; transição dimórfica.

Abstract

Validation of a molecular method for identification of fungi and *in vitro* investigation of the dimorphic transition in *Candida albicans*.

Fungal identification is limited by few morphological details and uncertainty in the biochemical tests. In the present work we developed a simple procedure, based upon DNA amplification of a 2,800 base pairs region followed by the amplicon digestion with *DdeI* and electrophoretic analyzes in agarose gels. After analyzing more than 400 samples encompassing 33 species, we demonstrate that this method discriminates as well as DNA sequencing of the region. This technology simplifies the search for new representatives among the great diversity of fungi of medical and industrial interest. We devised also molecular methods to discriminate between closely related species and described a new putative species. Next our work was dedicated to develop an *in vitro* assay for the study of the dimorphic transition in *Candida albicans*. We devised two biological assays and one that used an artificial membrane to investigate the induction and inhibition of hyphal production. The expression of genes associated with the morphological transition was examined in a quantitative way. We fractionated bovine fetal serum by column chromatography and obtained results pointing to fractions that stimulate or inhibit hyphal production.

Keywords: *Candida* spp.; identification by PCR-RFLP; Virulence factors; BFS fractionating; dimorphic transition.

Sumário

I. Introdução	13
1.1. Identificação das espécies	14
1.2. Indução da transição dimórfica em <i>Candida albicans</i>	16
II. Objetivos	21
2.1. Objetivos gerais do projeto.....	21
2.2. Objetivos específicos do projeto	21
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1. Materiais, soluções, meios de cultura e reagentes:	22
3.2. PCR, clonagem e seqüenciamento	24
3.2.1. PCR	25
3.2.2. Clonagem	25
3.2.3. Minipreparação do DNA plasmidial de bactéria pelo método da lise alcalina	25
3.2.4. Seqüenciamento do DNA plasmidial.....	26
3.2.5. Precipitação das reações de seqüenciamento	28
3.2.6. Seqüenciamento automático	28
3.3. Método PCR-RFLP.....	28
3.3.1. Identificação clássica e amostras utilizadas	28
3.3.2. Análise <i>in silico</i>	29
3.3.3. Extração de DNA em microplaca.....	29
3.3.3.1. Meio YPD caldo com e sem Tween e YPD sólido	30
3.3.3.2. Solução de lise.....	30
3.3.3.3. Eliminação de proteínas	30
3.3.3.4. Recuperação do DNA genômico	31
3.3.4. Amplificação por PCR.....	32
3.3.5. Digestão com a enzima <i>Ddel</i>	32
3.4. Identificação e diferenciação de <i>P. guilliermondii</i> , <i>C. palmioleophila</i> e <i>D. hansenii</i> por PCR em Tempo Real	33
3.4.1. Análise <i>in silico</i> de regiões do cistron ribossomal em busca de regiões para o desenho do ensaio de PCR em Tempo Real	33
3.4.2. Desenho de iniciadores e sondas TaqMan® “Minor Groove Binder” MGB para PCR em Tempo real	33
3.4.3. Ensaio da PCR em tempo real.....	34
3.5. Identificação e diferenciação de <i>C. rugosa</i> , <i>C. pararugosa</i> , e duas novas espécies, <i>Candida</i> sp. L96D e <i>Candida</i> sp. SK 75 por PCR em Tempo Real	34
3.5.1. Caracterização morfológica e bioquímica	34

3.5.1.1. Produção de tubo germinativo	35
3.5.1.2. Microcultivo	35
3.5.1.3. Fermentação de carboidratos	36
3.5.1.4 Sistema API 20 C AUX (bioMérieux, França)	36
3.5.1.5. Testes de sensibilidade aos antifúngicos	37
3.5.2. Caracterização molecular e desenho do ensaio para identificação/diferenciação por PCR em Tempo Real	38
3.5.3. Análise filogenética	40
3.6. Indução <i>in vitro</i> da transição dimórfica em <i>C. albicans</i>	40
3.6.1. Clonagem e expressão de HWP1 e ECE1	42
3.6.1.1. Análise <i>in silico</i> das proteínas e desenho dos iniciadores	42
3.6.2. Amplificação por PCR e clonagem	42
3.6.3. Cultura e superexpressão das proteínas recombinantes	43
3.6.4. Extração e purificação das proteínas recombinantes	44
3.7. Ensaio de filamentação e invasão do ágar	45
3.7.1. Ensaio empregando membrana biológica	45
3.7.2. Ensaio empregando membrana sintética de nitrocelulose	46
3.7.3. Microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura	46
3.7.4. Avaliação da expressão gênica de alguns genes envolvidos na transição dimórfica	46
3.7.4.1 Extração do RNA total (Trizol) e síntese de cDNA	47
3.7.4.2. Avaliação da eficiência dos iniciadores	48
3.7.4.3. Método do C _T comparativo com o sistema SYBR® Green	48
3.7.5. Imunoensaio para detecção das proteínas ECE1 e HWP1 na parede da hifa	50
3.7.5.1. Extrato total das formas filamentosas e leveduriformes	51
3.7.5.2. Ensaio ELISA	51
3.8. Fracionamento do soro fetal bovino	52
3.8.1. Preparo das colunas e amostra a ser fracionada	53
IV. Resultados	55
4.1. Extração de DNA em microplaca	55
4.2. Método PCR-RFLP	59
4.2.1 Análise <i>in silico</i> das seqüências de interesse	59
4.2.2. Validação <i>in vitro</i> dos padrões previstos para a enzima <i>Ddel</i>	61
4.2.2.1. PCR	61
4.2.2.2. Digestão com a enzima <i>Ddel</i>	65
4.2.2.3. Eletroforese em gel de agarose	66
4.2.2.4. Validação e abrangência do método	67
4.3. Identificação e diferenciação de <i>P. guilliermondii</i> , <i>C. palmioleophila</i> e <i>D.</i> <i>hansenii</i> por PCR em Tempo Real	73
4.4. Identificação e diferenciação de <i>C. rugosa</i> , <i>C. pararugosa</i> , e duas novas espécies, <i>Candida</i> sp. L96D e <i>Candida</i> sp. SK 75 por PCR em Tempo Real	75

4.4.1 Caracterização Morfológica: Macro e Microscópica	75
4.4.2. Caracterização Bioquímica: fermentação e assimilação	78
4.4.3. Perfil de susceptibilidade a antifúngicos.....	79
4.4.4. Caracterização molecular e filogenética.....	80
4.4.5. Uso da PCR em Tempo Real para identificação das espécies	82
4.5. Indução <i>in vitro</i> da transição dimórfica em <i>C. albicans</i>	84
4.5.1. Ensaio empregando membrana biológica	86
4.5.2. Ensaio empregando membrana sintética de nitrocelulose	86
4.5.3. Microscopia eletrônica de varredura	90
4.5.4. Avaliação da expressão gênica de alguns genes envolvidos na transição dimórfica.....	90
4.5.4.1. PCR em Tempo Real: avaliação da eficiência dos iniciadores	93
4.5.4.2. Método do C _T comparativo com o sistema SYBR® Green	93
4.5.5. Imunoensaio para detecção das proteínas ECE1 e HWP1.....	97
4.5.5.1 Análise <i>in silico</i> e desenho dos iniciadores.....	99
4.5.5.2. Clonagem em vetor de seqüenciamento e de expressão.....	104
4.5.5.3. Ensaio Elisa.....	108
4.6. Fracionamento do soro fetal bovino	111
V. Discussão.....	115
5.1. Identificação dos fungos.....	116
5.1.1. Extração do DNA total, método da microplaca.....	117
5.1.2. Método PCR-RFLP para identificação de fungos.	118
5.2. Uso da PCR em tempo real para genotipagem de fungos do gênero <i>Candida</i>	122
5.3. Indução <i>in vitro</i> da transição dimórfica de <i>C. albicans</i>	123
5.4. Fracionamento do soro fetal bovino.	138
5.5. Como se inicia a transição comensal-patogênico?	140
6. Conclusão.....	144
Referências.....	146
ANEXO I.....	156
ANEXO II.....	160
ANEXO III.....	161
ANEXO V	172
V.I. Pattern Identification Guide.....	Erro! Indicador não definido.
ANEXO VI.....	Erro! Indicador não definido.
ANEXO VI	Erro! Indicador não definido.

I. Introdução

O interesse pelos fungos do gênero *Candida* não é recente. Dados sobre esse gênero já eram publicados antes da década de 40 e em geral relacionados com os achados clínicos, algo que se perpetua até os dias de hoje. Anteriormente ao epíteto *Candida*, outros nomes eram usados como *Syringospora* e *Monilia*. *Syringospora* caiu em desuso e o gênero *Monilia* passou a ser classificado no filo Ascomycota, diferindo do gênero *Candida* a partir do táxon subfilo (Skinner e Fletcher, 1958).

O gênero conta hoje com 418 espécies anamórficas descritas ("Taxonomy – NCBI"), e esse número tende a aumentar: outros 1097 isolados (com base na seqüência de nucleotídeos do rDNA) estão classificados até o táxon gênero, aguardando a correta descrição da espécie.

A sistemática desses fungos é tarefa complexa e igualmente dinâmica, pois os estados anamórficos e telemórficos de uma mesma espécie podem estar classificados em gêneros distintos. Na fase assexuada, esses fungos se reproduzem por brotamento e normalmente essa é forma de reprodução resultante do cultivo nos meios de cultura usuais. Os fungos quando em fase telemórfica normalmente tendem a ser ascosporogêneos e esse é o motivo pelo qual se busca classificá-los como ascomicetos mesmo quando a forma de reprodução sexuada ainda não foi caracterizada (Guarro et al., 1999).

Apresentam capacidades assimilatórias oxidativas e fermentativas, tornando possível a utilização de diversas fontes orgânicas de energia. São descritos em uma ampla variedade de nichos ecológicos, geralmente como sapróvoros. No homem algumas espécies do gênero fazem parte da microbiota

normal de cavidades que se comunicam com o exterior, mais comumente a retal, oral e vaginal bem como em dobras cutâneas, como a virilha (Skinner e Fletcher, 1958; Soll, 2002).

1.1. Identificação das espécies

A classificação dos microrganismos, incluindo fungos microscópicos como as leveduras, é fortemente limitada pela relativa escassez de detalhes morfológicos e dificuldades na caracterização bioquímica. A aplicação de métodos moleculares baseados em seqüências nucleotídicas seja de RNAs estáveis como os ribossomais (rDNA), seja de outros genes ou seqüências de DNA, torna possível a utilização do genoma dos microrganismos como identificadores taxonômicos de alta precisão e sensibilidade.

A metodologia molecular, além da enorme contribuição para a taxonomia dos microrganismos, solidificou a noção de que apenas uma pequena fração dos organismos microscópicos encontrados na natureza é cultivável pelas técnicas atuais (Pace, 1997). Conseqüentemente, a abordagem molecular utilizando captura da seqüência por amplificação de DNA (PCR) ou RNA (RT-PCR) via iniciadores genéricos ou específicos, seqüenciamento completo ou parcial do amplicon e genotipagem por digestão com enzimas de restrição permitem identificação geralmente não ambígua das espécies microbianas ou fúngicas. Essas tecnologias ampliam a busca por representantes da imensa diversidade existente o que leva à identificação de novos grupos com muitas novas espécies que podem ser exploradas quanto ao potencial para a indústria, como a alimentícia ou bioenergética. Permite também a caracterização de novos patógenos envolvidos com doenças microbianas emergentes (Angent et al., 2005).

A identificação das diferentes espécies de *Candida* é particularmente importante em medicina. O aumento da imunodepressão causada pelo HIV (AIDS) ou decorrente de tratamentos médicos nos quais é necessário reduzir a resposta imunológica como em transplantados e durante o tratamento de certos cânceres, desnutrição, uso prolongado de catéteres endovenosos em procedimentos diversos, prematuridade infantil, etc., ampliaram muito a susceptibilidade da população às candidoses (Pfaller e Diekema, 2007). O diagnóstico usual baseado nas metodologias da microbiologia clássica demanda mais de uma semana de testes laboratoriais que englobam testes bioquímicos e morfológicos, empregando para esse fim uma bateria de meios de cultura distintos, contendo diferentes fontes de carbono.

A indústria buscou simplificar e abreviar o diagnóstico. Métodos baseados na utilização de diversas fontes de carbono vêm sendo utilizados com melhora significativa da qualidade de identificação. Um desses métodos é o API® 20C AUX (bioMérieux) que utiliza 19 fontes diferentes de carbono. O diagnóstico com tais métodos em geral demanda no mínimo três dias, mas não raramente há a necessidade de testes complementares para dirimir possíveis dúvidas na identificação. Para o sistema API, em média, cerca de 90% dos isolados são corretamente identificados, 6% não são passíveis de identificação e 4% acabam identificadas de maneira incorreta. Para certas espécies como *C. guilliermondii* e *C. famata* a incerteza do diagnóstico pode ser bem maior devido à grande semelhança na utilização das fontes de carbono existentes no sistema (Desnos-Ollivier, et al., 2008).

O seqüenciamento de partes selecionadas de regiões bem conhecidas do genoma, como a unidade de repetição que codifica para os genes

ribossomais 18S, 5.8S, 28S e 5S incluindo as regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 (Chen et al., 2001), é o método ideal para a identificação das diferentes espécies de *Candida*. No entanto esta metodologia no momento é laboriosa e requer uma estrutura cara para ser exeqüível.

A busca de alternativas, rápidas e baratas, à seqüência nucleotídica da região dos genes ribossomais, nos levou a explorar melhor uma metodologia que se iniciou no mestrado e envolvia a amplificação por PCR de um trecho seletivo do cistron ribossomal e subsequente digestão dos amplicons com enzimas de restrição que cortem freqüentemente esta região. Entre as enzimas testadas a enzima *Ddel* se revelou a mais apropriada. Inicialmente foram testadas apenas sete espécies do gênero *Candida* de grande importância médica (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*). O estudo piloto confirmou o potencial de diferenciação revelado *in silico* e permitiu a diferenciação das sete espécies.

Os resultados demonstraram ainda uma coincidência superior com o seqüenciamento comparada à identificação laboratorial usual ou API, além de mais rápido e barato. O estudo era preliminar e demandava uma análise com número significativo de amostras tipadas pelo método fenotípico laboratorial convencional e pelo padrão API, tarefa essa contemplada no presente trabalho de doutorado.

1.2. Indução da transição dimórfica em *Candida albicans*

Candida spp desenvolvem um estado comensal em indivíduos saudáveis, e nesse estado não causam doenças (Yang, 2003). Podem inclusive alcançar uma grande densidade populacional sem desenvolver, contudo, qualquer sintomatologia. Estima-se que *Candida spp* colonizem a

cavidade oral e anal de 26% da população de indivíduos saudáveis, essa frequência é inferior na cavidade vaginal de mulheres saudáveis, cuja estimativa é de 10%. Entretanto, não há consenso na literatura quanto às estimativas e a frequência das espécies nas diferentes partes do corpo. Há variação considerável de um estudo para outro, provavelmente por diferenças na coleta, diversidade entre populações, devido a usos e costumes diferentes e em função da idade (Soll, 2002). Contudo, em geral, esses estudos apontam *C. albicans* como a espécie mais freqüente, aproximadamente 70%, seguida de *C. glabrata* e *C. tropicalis* (cerca de 7%).

Algumas espécies desse gênero, principalmente *C. albicans*, são capazes de provocar infecções cutâneas, mucocutâneas e disseminadas, classificadas como micoses oportunistas (Andruti et al. 2000). Os pacientes imunocomprometidos são os mais suscetíveis às infecções. Incluem-se nesse grupo, os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), pacientes em tratamento quimioterápico para o câncer, terapia imunossupressora para transplante de órgãos ou medula (Sudbery et al., 2004) e neonatos de baixo peso (Anderson et al., 1998).

Como e por que um organismo comensal se torna patogênico? Essas perguntas vêm ao longo das últimas duas décadas intrigando diversos pesquisadores em vários centros de pesquisas. Definir virulência não tem sido tarefa fácil quando se trata de um fungo comensal: como definir inequivocamente os fatores relacionados ao comensalismo e aqueles relacionados à virulência? Como distinguir fatores ou genes responsáveis pela invasão, crescimento, colonização e sobrevivência dentro do hospedeiro sob uma nova situação específica – baixa imunidade – daqueles que estariam

desempenhando seu papel normal na fisiologia celular para se adaptar a um novo nicho? (Alonso-Monge et al. 2003).

O espectro adaptativo desse fungo ao hospedeiro humano revela um polimorfismo que varia de células isoladas a formas filamentosas tendo, tal plasticidade, implicações diretas na capacidade de sobreviver como um comensal em diversos sítios anatômicos, cada qual com seu próprio conjunto de pressões ambientais (Soll, 2002). A evidente adaptabilidade envolve certamente um sofisticado mecanismo capaz de responder eficientemente aos sinais do ambiente os quais resultam na mudança coordenada da fisiologia, anatomia e aderência celulares (Biswas et al., 2007).

A transição de comensal para patogênico pode ser um processo ativo regulado por uma pressão permanente do patógeno em relação ao hospedeiro e por um programa genético distinto, disparado por sinais químicos e físicos do ambiente (Brown, et al. 1999). A combinação entre esses fatores permitiriam não apenas a adaptação do fungo ao novo ambiente, mas também, preparar as células para o próximo estágio da infecção (Hube, 2004).

O mecanismo envolvido na transição comensal-patogênico ainda não foi esclarecido, mas a transição dimórfica certamente é um fator fundamental no processo. A transição dimórfica é a capacidade que o fungo tem de alternar entre as formas de crescimento leveduriforme e micelial (Alonso-Monge et al., 2003). A forma micelial é resultante da formação de tubos germinativos, provavelmente em resposta a mudanças na condição de crescimento a partir do hospedeiro que sinalizaria ao fungo uma necessidade de adaptação às condições do novo ambiente ou até mesmo uma dispersão em busca de um novo nicho, mais favorável ao crescimento (Biswas et al., 2007).

Essa transição é regulada por um complexo programa transcricional que modula não apenas a morfologia, mas também a expressão de diversos genes como os que codificam para proteínas da superfície celular envolvidas na adesão e desenvolvimento do biofilme, secreção de proteinases e fosfolipases ou enzimas de destoxificação de espécies reativas de oxigênio, ciclo de glioxilato e metabolismo de aminoácidos. Simultaneamente, outros genes têm sua expressão reduzida ou bloqueada (Fradin et al., 2003; Hube, 2004; Fradin e Hube 2006).

A associação entre a forma filamentosa e virulência está fartamente documentada na literatura. No entanto, experimentos *in vivo*, têm revelado que não é a forma vegetativa em si, mas sim, a transição entre as formas leveduriforme e filamentosa que dispara o mecanismo de patogênese (Alonso-Monge et al. 2003), muito provavelmente por existirem genes associados à virulência, diferentes daqueles associados à morfologia celular, que respondem aos mesmos indutores (Yang, 2003).

Atualmente, várias condições de cultivo que disparam o mecanismo da transição dimórfica, *in vitro*, como aderência, variação de pH, semi-anaerobiose, altas temperaturas, determinados aminoácidos e principalmente componentes presentes no soro fetal bovino (SFB), têm sido estudados (Riggle, et al. 1999). Alguns receptores que podem mediar à resposta para esses sinais já foram identificados, contudo o entendimento do processo ainda é incipiente e a relação comensal-patógeno-hospedeiro permanece obscura (Biswas et al., 2007).

Com base em resultados preliminares de um teste (DIAS, 2006) modificado neste laboratório, que induz em *C. albicans* a filamentação e

invasão do ágar, fomos levados a nos questionar se no SFB não existiria, além do indutor, um inibidor. Quanto a genes com expressão ativada ou reprimida neste processo muito se conhece (Brown, et al. 1999), contudo muito pouco se sabe sobre os componentes do soro responsáveis por essas respostas. Os resultados preliminarmente obtidos foram o início de uma série de abordagens diferentes, algumas novas, para estudar este fenômeno *in vitro*, objetivando progredir na compreensão da complexa relação entre o fungo e o meio, inicialmente para o processo da transição dimórfica, e quem sabe no futuro, a transição comensal-patogênico. Mais estudos nessa área podem revelar aspectos adicionais que ajudem a entender o mecanismo pelo qual *Candida spp* percebe e reage às variações no meio ambiente no qual está inserida.

II. Objetivos

2.1. Objetivos gerais do projeto

Validar e explorar a abrangência de um teste molecular baseado em PCR-RFLP capaz de identificar e/ou diferenciar espécies fúngicas, em especial *Candida* spp. e espécies relacionadas; explorar *in vitro* o fenômeno da transição dimórfica em *Candida albicans* como subsídio para avançar na questão de sua patogenicidade e identificar as moléculas indutoras e/ou inibidoras.

2.2. Objetivos específicos do projeto

1. Aperfeiçoar, validar e explorar a abrangência de uma metodologia baseada na amplificação do cistron ribossomal seguido de digestão do amplicon com enzimas de restrição que diferencie as espécies de *Candida* de maior importância médica e que seja comparável em fidelidade ao seqüenciamento do rDNA.

2. Desenvolver um ensaio para induzir a filamentação em *Candida spp* que possa ser prático e eficiente, permitindo a análise de diferentes substâncias estimuladoras ou inibidoras da filamentação assim como de amostras derivadas do fracionamento do SFB.

3. Identificar frações ativas com efeito na filamentação por meio de métodos cromatográficos de fracionamento e buscar sua purificação, para uma caracterização futura da natureza química da(s) espécie(s) ativa(s) purificada(s) o que permitirá levantar hipóteses sobre o provável sistema de transdução de sinal envolvido nesta sinalização e gerar novas estratégias experimentais para confirmação/refutação das propostas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais, soluções, meios de cultura e reagentes:

Os materiais descritos nessa sessão são de uso comum em várias rotinas, os reagentes específicos para os ensaios desenvolvidos são descritos em detalhes nas respectivas sessões.

Utilizamos água destilada e deionizada para as soluções contendo água como solvente. Para as soluções que necessitaram de outro reagente como solvente empregamos este sempre em grau analítico. Para a filtração usamos membranas de nitrocelulose de 0,22 μm em filtros (Nalgene®) de 150 ou 500 mL para grandes volumes ou filtros para seringa, também de 0,22 μm .

Acetato de Amônio (Quimex): para solução estoque a 5 M: 385,4 g e água q.s.p. 1 L.

Ácido etilenodiamino tetra acético, sal disódico (EDTA) (Merck): solução de estoque 250 mM: 93,06 g, água q.s.p. 1 L.

Acrilamida/N,N'-metilenobisacrilamida (BRL): solução estoque 30% (w/v) acrilamida e 1% (w/v) bisacrilamida em água, pH 7,0.

Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (SDS-PAGE): a eletroforese em gel poliacrilamida, com adição de 1% SDS, conduzida no sistema Mini PROTEAN® 3 Cell (BIO-RAD Laboratories Inc.) foi utilizada depois da purificação das proteínas recombinantes, e para analisar as frações obtidas no fracionamento do soro fetal bovino. O corante foi o Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (SIGMA).

BenchMark™ Protein Ladder. Cat. No. 10747-012 (Invitrogen by Life Technologies): padrão de peso molecular para gel SDS-PAGE que varia de 10 a 220 KDa.

Brometo de etídio (Merck): solução estoque 10 mg.mL⁻¹ em água.

Cloreto de Sódio (NaCl) (Merck): solução estoque 5 M: 292,2 g e água q.s.p. 1 L.

1,4-ditiotreitol (DTT) (Fermentas): solução estoque 1 M: 1,54 g e água q.s.p. 1 mL.

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Sigma): solução estoque 10% (w/v) em água.

Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (GIBCO BRL): solução de estoque 1 M: 1,74 g, água q.s.p. 1 mL.

Imidazol (VETEC): solução de estoque 1 M: 68,08 g e água q.s.p. 1 mL.

Isopropil-B-D-Tiogalactopiranosideo (IPTG) (USBTM): solução de estoque 1 M: 2,38 g, água q.s.p. 1 mL.

LA - Meio de Cultura LB acrescido de ampicilina: 1% Triptona (BD); 0,5% Extrato de Levedura (DIFCO); 5% NaCl (J. T. BAKER); 0,1% Dextrose (INLAB), pH 7,0; 50 mg.L⁻¹ de ampicilina (CALBIOCHEM).

Meio de cultura W/O (meio mínimo): 0,17% YNB (DIFCO), sem aminoácidos e sulfato de amônio; 0,5% sulfato de amônio; 2% dextrose, pH 6,5.

Meio de cultura YPD (meio completo com dextrose): 1% extrato levedura; 2% peptona (BD); 2% dextrose, pH 7,0.

N,N,N',N'-tetrametiletenodiamino (TEMED) (Merck): Líquido, usado diretamente.

Persulfato de amônio (BRL): solução estoque 10% (w/v) em água.

p-NPP em tampão para fosfatase alcalina: (p-Nitrophenyl phosphate disodium salt, hexahydrate, Research Organics), diluir 0,026 g do substrato em 2,5 mL do tampão 1 mM MgCl_2 , 50 mM Na_2CO_3 , pH 9,8.

Ribonuclease A de pâncreas bovino (RNase) (Sigma): Solução de estoque 10 mg.mL^{-1} . O preparo da solução estoque seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante.

Solução corante com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma): 0,7 g de Coomassie R-250, 35 mL de etanol (Merck) 70 mL de ácido acético glacial (Merck) e água q.s.p. 1 mL.

Solução descorante: 10% metanol (v/v) (Merck), 10% ácido acético (Merck) (v/v).

Sulfato de níquel (Synthy): solução estoque 100 mM: 2,63 g e água q.s.p. 100 mL

Tampão Fosfato de Sódio: solução estoque 1 M NaPO_4 , pH 7.4: A – 1 M Na_2HPO_4 ; B – 1 M NaH_2PO_4 ; Adiciona-se B em A até o pH desejado.

Tampão Glicina para eletroforese em SDS-PAGE: solução de estoque 10X: 192 mM Glicina (USB), 25 mM Tris-Cl, 0,1% (w/v) SDS. pH 8,0.

Tris (hidroximetil) aminometano, cloridrato (Tris-Cl) (Fisher Scientific): solução de estoque 1 M: 121,14 g, pH ajustado para 7,5 com HCl (Merk) e água q.s.p. 1L.

3.2. PCR, clonagem e seqüenciamento

Em várias etapas do trabalho recorreremos à PCR, clonagem de amplicons a serem seqüenciados; reações de seqüenciamento, seguida do seqüenciamento automático na plataforma ABI 3100 (Applied BiosystemsTM).

3.2.1. PCR

A PCR foi sempre realizada com o “kit” GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Optamos em todos os casos pelo volume final de 25 μL , e para tanto, foi utilizado 1X do tampão para PCR, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs, 0,4 μM de cada iniciador, 2 μL dos produtos de extração, 0,2 μL Taq DNA polimerase (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) e água ultrapura q.s.p.

A amplificação foi realizada no termociclador Express Thermal Cycler (Hybaid Limited), segundo o programa que consta de uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de: 95°C 30 s, 58-60°C 30 s, 72°C 1 min para 1000 bp. Tanto o T_m quanto o tempo de extensão variaram de acordo com o iniciador utilizado (Tabela 1) e tamanho do amplicon. Essas variações são descritas oportunamente.

3.2.2. Clonagem

Sempre que necessário, os amplicons foram clonados no vetor PCR[®]2.1-TOPO[®] com o conjunto de reagentes Topo TA Cloning[®] (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante para clonagem, e seleção dos transformantes.

3.2.3. Minipreparação do DNA plasmidial de bactéria pelo método da lise alcalina

Os clones selecionados foram inoculados em 3 mL de LA em erlemayer de 10 mL e permaneceram no incubador rotatório a 220 RPM por 16 h, 37°C. Depois da incubação, 1,5 mL da cultura foram transferidos para um microtubo tipo Eppendorf de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados por 30 s a 7500 g. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento foi repetido com o volume final da cultura. O precipitado foi ressuspensionado em 200 μL do tampão de extração

A (50 mM dextrose; 25 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 330 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ RNase). Foram adicionados então, 400 μL da solução de lise (20% SDS e NaOH 10 M), misturou-se gentilmente por inversão, seguido de incubação por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 400 μL da solução de neutralização (3 M acetato de potássio, pH 4,8) e homogeneizados por inversão, permanecendo, em seguida, no gelo por 20 min. Os tubos foram centrifuga-se por 15 min 7500 *g*.

Para precipitação do pDNA, 800 μL do sobrenadante foram transferidos para microtubos previamente preparados com 700 μL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e incubada a -20°C por 30 min. Depois desse período, foram centrifugados por 10 min 7500 *g*.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% e centrifugados por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e a secagem do precipitado ocorreu em temperatura ambiente. O precipitado final foi ressuspendido em 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA.

3.2.4. Seqüenciamento do DNA plasmidial

Os clones de interesse foram seqüenciados usando o conjunto de reagentes “BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing”. As reações de seqüenciamento foram preparadas em microtubos de 0,2 mL. Para uma reação de 10 μL foram utilizados 2,0 μL da mistura para seqüenciamento, 0,5 μM de cada iniciador, aproximadamente 800 ng de pDNA e água ultrapura q.s.p.

A amplificação foi realizada no termociclador Express Thermal Cycler Hybaid Limited, com um programa de 40 ciclos: 95°C 30 s; $50-60^{\circ}\text{C}$ 30 s e 60°C 2 min. O T_m variou conforme o iniciador utilizado (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores e sondas utilizados no tabalho

Nome	Sequência e orientação 5' para 3'	Tm °C	Referência
Iniciadores usados para amplificação e seqüenciamento do cistron ribossomal			
18S Fw	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	60	Medlin et al., 1998
18S Rev	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	60	
18S Fw1	GGTTGATYCTGCCAGWAGTCATATGC	60	Esse trabalho
18S Fw2	GCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGC	60	
28S Rev	GGTCCGTGTTTCAAGACGGG	60	
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	60	
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	60	White e Lee 1990
NS4	CTTCCGTCAATTCTTTAAG	58	
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	58	
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	60	
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58	
Uni-f	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	59	Fell, 1993
Uni-r	GGTCCGTGTTTCAAGACG	59	
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	50	Topo kit
M13 R	CAGGAA ACAGCTATGAC	50	
Iniciadores usados para amplificação da região N-terminal dos genes ECE1 e HWP1			
ECE1 Fw	CGGGATCCGCAACATTCCACAAGTAATCCAA	60	Esse trabalho
ECE1Rev	CGGGATCCTGAGCACGATTTTCAATACCGAC	60	
HWP1Fw	CGGGATCCACAGGTAGACGGTCAAGG	60	
HWP1Rev	CGGGATCCCGTTGGAATGTTTGAATAGG	59	
*Iniciadores e sondas TAQMAN usadas para identificação do grupo de <i>P. guilliermondii</i>			
ITS1 Fw	TGAACCTGCGGAAGGATCAT	59	Esse trabalho
5.8s Rev	TCCGTTGTTGAAAGTTTTGAAGATT	59	
<i>D. hansenii</i>	VICTTGTTATTACAAGAACTTTTGCMGBNFQ	70	
<i>P. guilliermondii</i>	6FAMTTGATACAGAACTCTTGCTTTGMGBNFQ	70	
<i>C. palmioleophila</i>	NEDCTTTATTAGAACTATTGCTTTGGCMGBNFQ	70	
*Iniciadores e sondas TAQMAN usadas para identificação do grupo de <i>C. rugosa</i>			
ITS1 Fw	TGAACCTGCGGAAGGATCAT	60	Esse trabalho
RRev	GATGCGAGAACCTAGAGATCCGT	60	
<i>C. mesorugosa</i>	VICTACTGTTTAACTGTGTCTGAGMGBNFQ	70	
<i>C. metarugosa</i>	6FAMCACACAAATTAACCCTAACCATAMGBNFQ	70	
<i>C. rugosa</i>	NEDATAACTTCAAGTACCGATCATCMGBNFQ	70	
<i>C. pararugosa</i>	6FAMTGTGAAACAAATGATAAGCTMGBNFQ	70	

O sítio de restrição para *Bam*H1 encontra-se sublinhado nos iniciadores para os genes ECE e HWP1. Nas sondas o fluoróforo, tipo de sonda e *quencher*, estão em negrito.

*A síntese das sondas foi realizada pela Applied Biosystems.

3.2.5. Precipitação das reações de seqüenciamento

Seis microlitros da solução NG (1 mg.mL^{-1} de glicogênio dissolvido em 5 M NH_4OAc) foram adicionados aos tubos, seguido de um pulso em centrifuga. Foram adicionados 50 μL de etanol 95% homogeneizando-se por inversão e mantidos a -20°C por 30 min.

Os tubos foram centrifugados a 2500 g por 40 min a 4°C . O sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado duas vezes com 110 μL de etanol 80% com centrifugação entre as lavagens a 2500 g por 10 min a 4°C . A secagem do precipitado final ocorreu em temperatura ambiente.

3.2.6. Seqüenciamento automático

As amostras foram dissolvidas em 10 μL de formamida, submetidas à desnaturação por 5 min a 95°C , seguido de um rápido resfriamento em gelo. O seqüenciamento ocorreu em um sistema de eletroforese capilar automático (ABI 3100, Applied Biosystems).

3.3. Método PCR-RFLP

O desenvolvimento do método de identificação seguiu etapas seqüenciais que se iniciou com (1) criteriosa análise *in silico*, visando à predição de padrões discriminantes para as espécies estudadas, (2) avaliação dos padrões obtidos *in vitro* com aqueles previstos e (3) validação desses padrões com aplicação do método a um grande número de amostras e correlação com a sequência de DNA da região.

3.3.1. Identificação clássica e amostras utilizadas

As linhagens e isolados das espécies identificadas foram obtidos junto à Faculdade de Odontologia da UNESP de São José dos Campos, Laboratório

de Microbiologia da UNIVAP, Laboratório bioMérieux Brasil e Fundação Oswaldo Cruz.

A metodologia clássica de identificação consistiu de provas de assimilação, fermentação, microcultivo e tubo germinativo. Todos esses testes foram realizados em colaboração com o laboratório de microbiologia da UNESP de São José dos Campos.

3.3.2. Análise *in silico*

As seqüências de interesse para proceder à análise, *in silico*, dos padrões a serem gerados por endonucleases de restrição foram obtidas da base de dados do GenBank NCBI. As seqüências foram analisadas com o auxílio da ferramenta “MapDrawTM” para Windows versão 5.00 do DNASTAR[®] Lasergene[®] que gera um mapa para cada seqüência indicando a posição dos sítios de restrição que cada enzima reconhece. As tabelas foram comparadas entre si para a escolha da enzima com o melhor padrão de restrição. Duas análises complementares de alinhamentos de seqüência foram realizadas. A primeira foi o alinhamento de múltiplas seqüências com o programa ClustalX v. 1.8 (Larkin et al., 2007). A segunda foi a comparações dos arquivos “Singlets” (seqüências fasta) com o banco de seqüências nucléicas (nt), utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (Altschul et al, 1990), configurado na opção “blastn”, ou ainda o alinhamento global com o algoritmo Needle-Wunsch, disponíveis no sítio do NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db>).

3.3.3. Extração de DNA em microplaca

Para estabelecer a condição ideal de extração do DNA total em microplacas, o protocolo foi desenvolvido em etapas: inóculo, lise, purificação, precipitação e recuperação do DNA extraído.

3.3.3.1. Meio YPD caldo com e sem Tween e YPD sólido

Alíquotas de 150 μL do meio YPD e YPD acrescido de Tween 20 a 0,001% v/v foram distribuídas em duas microplacas de 96 poços. Uma pequena quantidade de células foi inoculada em cada poço com “frog” de 96 pinos e as placas foram incubadas a 30°C pela noite, sem agitação. Essas mesmas amostras também foram cultivadas em meio YPD sólido e nesse caso, sem adição de Tween.

As placas contendo YPD caldo foram centrifugadas a 2500 g por 5 minutos a 20°C e o meio sobrenadante foi descartado por inversão das placas.

3.3.3.2. Solução de lise

As células foram dispersas em 100 μL de cinco diferentes condições de lise. Teste 1: água ultrapura, seguido de incubação a 95°C por 5 min. Teste 2: tampão 1 (100 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5) acrescida de SDS para concentração final de 1%. Teste 3: tampão 1 acrescido de 25 mM DTT e 1% SDS. Para os testes 2 e 3 a temperatura e período de incubação após a adição da solução de lise foi 65°C por uma hora. Teste 4: tampão 1 acrescido de 1 M sorbitol e Zymolyase® 165 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (concentração final). O teste 5 corresponde às condições do teste 4 mais DTT para concentração final de 25 mM. Para os testes 4 e 5, o tempo de incubação a 37°C foi 30 min e depois desse período, adicionamos 1% SDS, seguido de incubação a 65°C por 30 min.

3.3.3.3. Eliminação de proteínas

Os lisados foram tratados com diferentes concentrações de acetato de potássio para estabelecer qual a melhor concentração, variando de 0 a 2,5 M (v/v de 5 M acetato de potássio). As placas permaneceram no gelo por 5 min e

em seguida foram centrifugadas por 25 min 4°C 2250 *g*, para precipitar as proteínas insolubilizadas. Dez microlitros do sobrenadante foram analisados em 10% SDS-PAGE corado com Coomassie Brilhante Blue R-250.

3.3.3.4. Recuperação do DNA genômico

Foram testados seis procedimentos para precipitação e recuperação do DNA. O volume do sobrenadante resultante do tratamento com acetato de amônio foi de 150 μL , e os tratamentos foram realizados em microplacas de 96 poços previamente preparadas como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Tratamentos utilizados para recuperação do DNA extraído

	Carregador Acrilamida	NaOAc 2,5M	Isopropanol		Carregador* Acrilamida	NaCl 5M	Etanol absoluto
Condição 1	-	-	150 μL	Condição 4	-	-	150 μL
Condição 2	-	15 μL	150 μL	Condição 5	-	7,5 μL	150 μL
Condição 3	20 μg	15 μL	150 μL	Condição 6	20 μg	7,5 μL	150 μL

* Método proposto por Gaillard e Strauss, (1990).

As placas foram mantidas em gelo por 15 min e em seguida centrifugadas (2250 *g* 4°C) por 15 min. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 80% (centrifugação a 4°C e 2250 *g* por 5 min) deixado secar em temperatura ambiente e então redissolvido em 30 μL do tampão TE-RNase (10 mM TE, 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ RNase, pH 7,5). Dois microlitros do produto de extração foram aplicados em 1% gel de agarose para análise imediata, o restante permanecendo a 37°C pela noite e novamente analisados em gel de agarose para verificar se havia sinais de DNA degradado.

Alíquotas contendo 100 ng de DNA plasmidial purificado foram submetidas às mesmas condições de precipitação e estas foram redissolvidas em 15 µL de água ultrapura. Aplicou-se o volume total em gel de agarose e como padrão para comparação da quantidade de DNA plasmidial recuperado, utilizamos diluições da solução original, aplicando ao gel 20 ng, 60 ng e 100 ng.

3.3.4. Amplificação por PCR

A reação de PCR foi usada para amplificar uma região do rDNA contendo em média 2800 bp na qual estão inclusos os genes 18S e 5.8S completos, as regiões ITS1 e 2 completas, e a extremidade 5' do gene 28S. Os iniciadores usados foram o 18S Fw2 e Uni-r (Tabela 1).

3.3.5. Digestão com a enzima *DdeI*

Entre as enzimas analisadas, optamos pela *DdeI* (NEB), pois, pela análise *in silico*, apresentou um grande potencial de diferenciação. A reação de digestão seguiu as normas do fabricante: 1X tampão 3 (NEB), 500 ng de DNA (em média, 5 µL do produto da PCR são suficientes), 5 U da enzima e água ultrapura para um volume final de 25 µL. A digestão foi incubada inicialmente por 2h e em virtude dos resultados obtidos, adotou-se a incubação por 4h usando 2 U da enzima.

Para eletroforese usamos o sistema Mini-Subcell® GT da BioRad, uma bandeja para gel de 10 cm de comprimento por 7 cm de largura com um pente de 8 dentes de 50 mm de largura por 1 mm de espessura; e uma bandeja de 15 cm de largura por 18 cm de comprimento com pente de 20 dentes de 50 mm de largura por 1 mm de espessura.

O volume total da digestão foi carregado em 2% gel de agarose corado com $0.5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ brometo de etídio. Procedemos à eletroforese em presença do tampão de corrida TBE 1X a 100 V por 90 min e para tanto, usamos a fonte da BioRad modelo PowerPac 300. Após o término da corrida o gel foi exposto ao transluminador Fotodyne FOTO/UV-26, com máscara de proteção e filtro apropriado para o brometo de etídio, acoplada à máquina digital Canon Power Shot SX120 IS.

Para avaliar a viabilidade de géis comerciais, testamos o sistema E-Gel 2% agarose G5018-02 (Invitrogen™).

3.4. Identificação e diferenciação de *P. guilliermondii*, *C. palmioleophila* e *D. hansenii* por PCR em Tempo Real

3.4.1. Análise in silico de regiões do cistron ribossomal em busca de regiões para o desenho do ensaio de PCR em Tempo Real

Foram analisadas para os três fungos, as regiões ITS1, ITS2 e D1/D2 do 28S rDNA. Para *Candida palmioleophila* foi necessário seqüenciar o cistron ribossomal, pois não havia informação suficiente na base de dados de sequencias nucleotídicas. Arquivos tipo FASTA das seqüencias foram criados para proceder ao alinhamento múltiplo com o programa ClustalW.

3.4.2. Desenho de iniciadores e sondas TaqMan® “Minor Groove Binder” MGB para PCR em Tempo real

Uma vez tendo analisado as regiões com polimorfismo de seqüência entre as espécies, utilizamos o programa PrimerExpress™ v. 2.0 para verificar qual delas geraria a melhor combinação de iniciadores e sondas para o ensaio.

Manteve-se a configuração sugerida pelo programa, escolhendo as possibilidades com T_m de 60°C para iniciadores e 70°C para as sondas.

3.4.3. Ensaio da PCR em tempo real

Para a validação do ensaio, seguimos o protocolo sugerido pelo fabricante. Inicialmente definiu-se a concentração dos iniciadores e em seguida a concentração das sondas. Definida as concentrações de sondas e iniciadores, verificamos os limites confiáveis para a concentração do DNA alvo.

Para uma reação com volume final de 15 µL ficou estabelecido: 1X Master Mix TaqMan[®], 100 nM de cada iniciador e 200 nM da sonda específica (Tabela 1), DNA alvo entre 0,1 e 50 ng, e água ultrapura q.s.p. As condições de amplificação são as sugeridas pelo fabricante: 50°C 2 min; 95°C 10 min seguido de 30 ciclos de 95°C 15 s e 60°C 1 min. Os ensaios foram realizados no sistema de PCR em tempo real ABI 7300 (Applied BiosystemsTM).

Depois de estabelecidas as condições ideais para o ensaio, procedemos a três outros testes, (1) um ensaio multiplex, contendo as três sondas e o DNA alvo de apenas uma espécie; (2) mistura de DNA das três espécies e apenas uma sonda; e (3) mistura de DNA das três espécies em um ensaio multiplex contendo as três sondas.

3.5. Identificação e diferenciação de *C. rugosa*, *C. pararugosa*, e duas novas espécies, *Candida* sp. L96D e *Candida* sp SK 75 por PCR em Tempo Real

3.5.1. Caracterização morfológica e bioquímica

As amostras foram caracterizadas com base nas provas descritas por Sandvén (1990), Williams e Lewis (2000) e Koneman et al., (2001).

Cada isolado foi semeado em YPD sólido e um meio cromogênico diferencial (ChromAgar™ *Candida*) para serem examinadas quanto às características morfológicas (cor, tamanho, forma e superfície). Além do cultivo normal a 30°C, as amostras foram submetidas ao crescimento a 25, 37 e 45°C.

Para cada colônia isolada obtida após crescimento em YPD foi realizado um esfregaço em lâmina e corado pelo método de Gram para observação das características microscópicas.

3.5.1.1. Produção de tubo germinativo

Cada cultura pura foi semeada em placa de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose e incubada a 37°C por 24 horas. Para a prova de produção de tubo germinativo adicionou-se uma alçada da cultura de levedura, em tubo de ensaio (13 x 170 mm) contendo 0,5 mL de soro fetal bovino estéril. Os tubos de ensaio semeados foram colocados em banho-maria a 37°C pelo período de 2 a 3 horas. Durante este período, a formação ou não de tubo germinativo foi observada em microscopia de contraste de fase colocando-se uma gota da suspensão entre lâmina e lamínula. Foi utilizado como controle positivo *C. albicans* ATCC 10231.

3.5.1.2. Microcultivo

Para esta prova foi utilizado o meio *Corn Meal Agar* (Difco) 1% Tween 80. O meio foi esterilizado e em seguida distribuído em lâminas posicionadas no interior de placas de Petri esterilizadas, com auxílio de uma pipeta estéril de 10 mL. Após a solidificação do ágar, cada amostra de levedura (cultura de 24 horas) foi semeada em estria única na superfície do meio e uma lamínula foi posicionada sobre a estria. Uma porção de algodão esterilizado e umedecido

foi colocada no interior de cada placa, para evitar a dessecação do meio de cultura. Este conjunto foi incubado por 72 horas em temperatura ambiente, quando então foi realizada a leitura em microscopia de contraste de fase para observar presença ou ausência de clamidoconídeos, hifas, pseudohifas e leveduras. Foi utilizado como controle positivo, *C. albicans* ATCC 10231.

3.5.1.3. Fermentação de carboidratos

Para a realização desta prova foi utilizado o Caldo Vermelho de Fenol (Difco) distribuído em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos em seu interior. Os tubos foram autoclavados a 120°C por 15 min. A seguir, os carboidratos (glicose, maltose, sacarose, galactose e lactose) previamente esterilizados por filtração (Filtro Millipore, GSWP-02500), foram adicionados para uma concentração de 1%. Em seguida, cada tubo foi inoculado com 100 µL da suspensão de levedura, feita a partir de uma cultura pura de 24 horas ágar Sabouraud dextrose, com turvação equivalente a escala 0,5 de MacFarland. As leituras foram realizadas após 48 horas e uma semana de incubação a 37°C, observando-se se houve a mudança de cor do vermelho para o amarelo, indicando a produção de ácido e se apareceram bolhas de ar aprisionadas nos tubos de Durhan, indicando a produção de gás.

3.5.1.4 Sistema API 20 C AUX (bioMérieux, França)

Para a identificação com o sistema API, preparou-se uma suspensão contendo células de cultivo pela noite a 37°C em ágar Sabourad dextrose. A suspensão de 2 mL em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) foi padronizada na escala 2 de McFarland (bioMérieux, França). Cem microlitros desta suspensão foram adicionados ao meio de cultura API C Medium fornecido no conjunto de reagentes e homogeneizado. O meio API C contendo

as células foi usado pra preencher os poços da tira de identificação, deixando uma superfície ligeiramente convexa.

As tiras foram incubadas a 30°C e a leitura realizada em duas etapas: a primeira após 48 h e a segunda após 72 h de incubação. Os padrões de assimilação geram um código numérico que ao ser inserido no programa acessado pelo endereço eletrônico <https://apiweb.biomerieux.com/identifica> a espécie correspondente, indicando o grau de acerto, sendo adotado como porcentagem aceitável de identificação um valor acima de 80%.

3.5.1.5. Testes de sensibilidade aos antifúngicos

As cepas foram testadas quanto à sensibilidade, *in vitro*, aos antifúngicos fluconazol, cetoconazol, anfotericina B, nistatina e 5-fluorocitosina. Para obtenção do inóculo, as amostras de *Candida* spp. foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas durante 24h a 37°C. Após este período, foram selecionadas cinco colônias com diâmetro superior a 5 mm e suspensas em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) obtendo-se uma concentração inicial de $1-5 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Posteriormente, a suspensão foi diluída 1:2000 em meio sintético RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 com MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico) para se obter uma concentração final de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ células.mL⁻¹. As drogas anfotericina B e 5-fluorocitosina foram solubilizadas em dimetil sulfóxido (DMSO), enquanto fluconazol e cetoconazol foram solubilizados em água destilada estéril. As drogas foram preparadas nas seguintes concentrações: 320 µg.mL⁻¹ para anfotericina B e nistatina, 640 µg.mL⁻¹ para cetoconazol, 1mg.mL⁻¹ para 5-fluorocitosina e 1,25 mg.mL⁻¹ para fluconazol. As soluções das drogas foram diluídas em meio RPMI para se obter concentrações finais que correspondem às seguintes faixas de intervalo: 4 a

0,02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para anfotericina B e nistatina; 64 a 0,02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cetoconazol e 5-fluorocitosina e 128 a 0,02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para fluconazol.

Para realização das microdiluições foram utilizadas placas de acrílico com 96 poços de fundo chato e com tampa (Difco). Em cada poço foram dispensados 100 μL da concentração da droga antifúngica e 100 μL do inóculo da amostra-teste. As placas foram então incubadas a 37°C e as leituras realizadas depois de 24 e 48 h. Durante a incubação, as placas com o fármaco anfotericina B, foram embaladas com papel alumínio para que não houvesse exposição à luz.

A leitura dos resultados foi baseada em escala de turbidez visual pela turvação de um poço controle representada por: 0 (totalmente claro); 1 (levemente turvo); 2 (turbidez intermediária) referente a 80% da redução de crescimento; 3 (turbidez proeminente) e 4 (totalmente turvo).

Os resultados foram expressos com intervalos de variação de mínimos e máximos valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos por cada espécie de *Candida*. Os valores de CIM50 e CIM90 foram observados. Estes valores representam a concentração do fármaco que inibe o crescimento de 50% e 90% dos isolados, respectivamente. O método de microdiluição e os pontos de corte das drogas testadas para a classificação dos isolados em suscetíveis ou resistentes seguiram padrões estabelecidos (M27-A2 NCCLS, 2005) (Tabela 3).

3.5.2. Caracterização molecular e desenho do ensaio para identificação/diferenciação por PCR em Tempo Real

Foi necessário seqüenciar o cistron ribossomal das quatro espécies para então desenhar os iniciadores e sondas a serem usados no ensaio da PCR em

tempo real, pois não havia informação suficiente na base de dados de sequências nucleotídicas. Estas sequências estão depositadas no GenBank sob os números: GU144663 (*C. rugosa* ATCC 10571), GQ176145 (*Candida* sp. SK75), GQ139517 (*C. pararugosa*). *Candida* sp. L96D também teve o cistron seqüenciado, mas optamos por depositá-la depois a publicação do artigo.

Tabela 3. Pontos de corte para interpretar os testes de suscetibilidade em leveduras.

Antifúngico	Sensível	S-DD	Intermediária	Resistente
Fluconazol	>8	16-32	-	>64
5-fluorocitosina	<4	-	8-16	>32
Cetoconazol	< 8	> 16	-	-

S-DD = sensível dose dependente. Dados em $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Os amplicons foram gerados com os iniciadores 18S Fw e Uni-R (Tabela 1), o Tm foi ajustado para 59°C e tempo de extensão de 3 min. O amplicon de aproximadamente 2800 bp foi clonado e seqüenciado como previamente descrito.

As regiões ITS1, ITS2 e D1/D2 do 28S rDNA foram analisadas para os quatro fungos. Arquivos tipo FASTA das sequências foram criados para proceder ao alinhamento múltiplo com o programa ClustalW. Uma vez tendo analisado as regiões com polimorfismo de seqüência entre as espécies, utilizamos o programa PrimerExpress v. 2.0 para verificar qual delas geraria a melhor combinação de iniciadores e sondas para o ensaio. Manteve-se a configuração sugerida pelo programa, escolhendo as possibilidades com Tm de 60°C para iniciadores e 70°C para as sondas.

3.5.3. Análise filogenética

As sequências nucleotídicas oriundas desse trabalho e aquelas obtidas dos bancos de dados (GenBank, EMBL e DDBJ) foram alinhadas pelo programa ClustalW. Os alinhamentos múltiplos foram agrupados tendo como critério sequências idênticas. Quatro grupos foram gerados e outras 10 sequências não se inseriram em nenhum dos grupos e foram mantidas isoladas (Tabela 4). Para construir a árvore filogenética, usamos uma sequência representativa de cada grupo além das 10 sequências isoladas.

O modelo de substituição foi escolhido usando a ferramenta Best-Fit, a história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969). Uma árvore consenso, criada a partir de 1000 replicatas utilizando o teste filogenético “bootstrap”, foi construída para inferir a história evolutiva dos táxons analisados (Felsenstein, 1985). A árvore foi construída em escala, com comprimentos de ramo representando o número de substituições por posição. A análise envolveu 14 sequências de nucleotídeos. Havia um total de 440 posições no conjunto de dados final; todas as posições que continham lacunas e falta de dados foram eliminadas (“complete deletion”). Todas as ferramentas utilizadas nesta etapa foram do MEGA5 (Tamura et al., 2011).

3.6. Indução *in vitro* da transição dimórfica em *C. albicans*

O ensaio de indução da transição dimórfica de *C. albicans* visou não apenas a mudança morfológica de levedura para micélio, mas buscamos investigar se marcadores de virulência já descritos na literatura estavam sendo expressos.

Tabela 4. Sequências usadas na análise filogenética

Grupo	Database ID	Cepa	Referencia
	AB437388.1	<i>C. rugosa</i> , strain R1-21	Am-in et al. (unpublished)
	AB437389.1	<i>C. rugosa</i> , strain R1-5	Am-in et al. (unpublished)
	FJ768918.1	<i>Candida</i> sp, strain L2683B	Chaves et al. (unpublished)
	DQ234791.1	<i>Candida</i> sp, strain XH1164	Li et al. (2006)
	GQ176145.1	<i>Candida</i> sp, strain SK75	Mota et al.(This study)
	AB617955.1	<i>C. rugosa</i> , strain LM074	Koowadjanakul et al. (unpublished)
	AB617974.1	<i>C. rugosa</i> , strainLM053	Koowadjanakul et al. (unpublished)
	JF757236.1	<i>C. rugosa</i> , strain 18	Akabanda et al. (unpublished)
	HQ412589.1	<i>C. rugosa</i> , strain STC1	Tay et al. (2011)
	GQ139517.1	<i>C. pararugosa</i>	Mota et al. (This study)
Group 1	AB437386.1	<i>C. rugosa</i> , strain RV2	Am-in et al. (unpublished)
	AB437387.1	<i>C. rugosa</i> , strain RV147	Am-in et al. (unpublished)
	AB436404.1	<i>C. rugosa</i> , strain EB2	Boonmak et al. (unpublished)
	AB436405.1	<i>C. rugosa</i> , strain EB4	Boonmak et al. (unpublished)
	AB436406.1	<i>C. rugosa</i> , strain EF1	Boonmak et al. (unpublished)
	AB498988.1	<i>C. rugosa</i> , strain LYSM3	Kaewwichian et al. (unpublished)
	AB617952.1	<i>C. rugosa</i> , strainLM050	Koowadjanakulet al.(unpublished)
	AB617960.1	<i>C. rugosa</i> , strainLM060	Koowadjanakulet al.(unpublished)
	AB617966.1	<i>C. rugosa</i> , strainLM066	Koowadjanakulet al.(unpublished)
	AB617972.1	<i>C. rugosa</i> , strainLM072	Koowadjanakulet al.(unpublished)
	AF374612.1	<i>C. rugosa</i>	Cocolin et al. (2002)
	EF375701.1	<i>C. rugosa</i> , strain 8	Wand and Chi (unpublished)
	FJ873551.1	<i>C. rugosa</i> , strain EU17S11	Lee et al. (Unpublished)
	HQ412590.1	<i>C. rugosa</i> , strain STC4	Tay et al. (2011)
	HQ860277.1	<i>C. rugosa</i> , Z9Y9	Wang (unpublished)
Group 2	DQ900955.1	Uncultured Saccharomycetales	Bonito et al. (2010)
	FJ768916.1	<i>Candida</i> sp, strain L154	Chaves et al. (unpublished)
	FJ768917.1	<i>Candida</i> sp, strain L69D	Chaves et al. (unpublished)
	FJ768919.1	<i>Candida</i> sp, strain L412D	Chaves et al. (unpublished)
Group 3	FJ768920.1	<i>Candida</i> sp, strain L387A	Chaves et al. (unpublished)
	DQ900948.1	Uncultured fungus	Bonito et al. (2010)
	FJ768915.1	<i>C. rugosa</i> , strain ATCC 10571	Chaves et al. (unpublished)
	GU144663.1	<i>C. rugosa</i> , strain ATCC 10571	Mota et al. (This study)
	GU246244.1	<i>C. rugosa</i> , strain CBS 613	Groenewald and Smith (2010)
	GU246245.1	<i>C. rugosa</i> , strain CBS 2016	Groenewald and Smith (2010)
Group 4	U45727.1	<i>C. rugosa</i> , strain CRU45727	Tay et al. (2011)
	EU056285.1	<i>Candida</i> , strain MZKI K-259	Butinar et al. (2011)
	EU056286.1	<i>Candida</i> , strain MZKI K-269	Butinar et al. (2011)

3.6.1. Clonagem e expressão de HWP1 e ECE1

Os ensaios de clonagem e expressão foram realizados em colaboração com o Laboratório de Genética Molecular do IB/USP sob supervisão do Dr. Luis Eduardo Soares Netto.

3.6.1.1. Análise *in silico* das proteínas e desenho dos iniciadores

As sequências de interesse foram obtidas a partir do banco “Protein” do NCBI, depositadas sob os números YSAECE1A (ECE1) e XM_707905 (HWP1). As sequências foram analisadas *in silico* com as ferramentas TMHMM v. 2.0 (Transmembrane Helices Hidden Markov Models: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para a predição de domínios transmembrana e o “SignalP 3.0 server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para a predição de peptídeo sinal (Bendtsen, 2004).

Os iniciadores foram desenhados com auxílio da ferramenta “Primer Express® v. 2.0” tendo como alvo a região N-terminal das proteínas e optamos em inserir o sítio de restrição para *Bam*HI nos iniciadores para facilitar o procedimento de clonagem adiante.

3.6.2. Amplificação por PCR e clonagem

A amplificação, clonagem e seqüenciamento ocorreram nas condições estabelecidas anteriormente e os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1. Vários clones confirmaram as sequências de interesse, escolhemos dois clones de cada construção para a clonagem em vetor de expressão.

Os pDNAs contendo o inserto validado pelo seqüenciamento foram digeridos com a enzima *Bam*H1 (NEB), seguindo o protocolo padrão do fabricante. O produto da digestão foi carregado em 1% gel de agarose corado com brometo de etídio, as bandas correspondentes ao tamanho esperado para

os insertos foram recortadas do gel e eluídas usando o “Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System” (Promega). O DNA purificado foi quantificado no Qubit® com o “Quant-iT™ Pico Green® dsDNA BR Assay” (Invitrogen).

O vetor de expressão pET-15b (Novagem BEM Biosciences, Inc.; vetor com promotor viral T7lac, induzido por IPTG e que codifica uma cauda de polihistidina N-terminal) foi digerido com *Bam*H1 segundo a reação: 3 µg de vetor, 1X concentração final do tampão da enzima, 15 U de enzima, 100 ng de BSA e água livre de nuclease para um volume final de 30 µL. A reação foi mantida a 37°C por 4h; o produto da digestão foi carregado em 1% gel de agarose corado com brometo de etídio e a banda, correspondente ao vetor linearizado, foi recortada do gel, eluída e quantificada conforme já descrito anteriormente.

A ligação inserto/vetor foi realizada com o jogo de reagentes “DNA ligation” (Novagem) seguindo o protocolo padrão do fabricante. Para a transformação escolhemos a linhagem BL21 Star™ (DE3) de *E. coli*, genótipo: $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm rne$ 131 (Invitrogen) quimicamente competente, seguindo as recomendações do fabricante para clonagem e seleção dos transformantes.

3.6.3. Cultura e superexpressão das proteínas recombinantes

As linhagens transformantes foram inoculadas em LA e incubadas pela noite a 37°C sob agitação. Após esse período, o pré-inóculo foi diluído em 1 litro de LA até a OD₆₀₀ de 0,1 e mantidas em incubação a 37°C por aproximadamente 3 horas, até atingirem a OD₆₀₀ de 0,5. Adicionamos IPTG ao meio de cultura para a concentração final de 0,5 mM, seguido de um período de incubação por 4 h a 37°C.

3.6.4. Extração e purificação das proteínas recombinantes

A cultura foi centrifugada a 3000 *g* por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 25 mL do tampão de lise (20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,4; 500 mM NaCl; 50 mM Imidazol). Em seguida, foi adicionado PMSF para uma concentração final de 1 mM. As células foram submetidas a cinco ciclos de sonicação no Sonicator Ultrasonic Processor (Heat Systems) por um período de 30 s, seguidos de 30 s de descanso permanecendo no gelo durante todo o processo. Após a lise o sistema foi colocado em banho de gelo sob agitação e foi adicionado sulfato de estreptomicina para uma concentração final de 1%. Depois de 20 min o lisado foi centrifugado por 40 min a 30000 *g*, 4°C. O sobrenadante contendo o extrato protéico solúvel foi submetido à purificação da proteína de interesse.

As proteínas recombinantes contendo a cauda de poli-histidina foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal utilizando a coluna de afinidade contendo níquel imobilizado Ni-NTA Superflow Cartridge (Quiagen) (5 mL) com eluição controlada por bomba peristáltica P1 (Pharmacia).

A coluna foi inicialmente lavada com 10 VC (volume da coluna) de água ultrapura, em seguida, foi carregada com 2 VC de 0,1 M sulfato de níquel. Para retirar o excesso de níquel a coluna foi novamente lavada com 10 VC de água ultrapura e equilibrada com 10 VC do tampão de ligação (20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,4; 500 mM NaCl; 50 mM Imidazol). O extrato foi então carregado na coluna e a eluição seguiu o esquema abaixo para cada proteína:

Proteína Ece1:

3 VC: 50 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.4.

2 VC: 100 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.4.

1 VC: 150 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.4.

1 VC: 200 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.4.

4 VC: 500 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.4.

Proteína Hwp1:

3 VC: 50 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.4.

2 VC: 100 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.4.

1 VC: 150 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.4.

4 VC: 500 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7.4.

O eluente foi sendo coletado em frações de 1 mL. As frações correspondentes a ultima etapa da eluição foram submetidas ao ensaio colorimétrico de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), para tanto, 20 µL de cada fração foram adicionados em 500 µL do reagente observando-se aquelas frações que promoviam uma mudança na coloração do reagente para azul.

As frações positivas para o ensaio de Bradford foram então analisadas em SDS-PAGE para verificar a qualidade da purificação. Os peptídeos purificados de ambas as proteínas foram enviados ao Instituto Butantã sob os cuidados da Dra Marilena Damasi, para obtenção de anticorpos policlonais a serem usadas em etapa futura.

3.7. Ensaio de filamentação e invasão do ágar

3.7.1. Ensaio empregando membrana biológica

Nesse modelo, utilizamos ovo de codorna (*Nothura maculosa*). Depois da descalcificação com 10% ácido acético, fizemos cinco diálises sucessivas em solução supersaturada de sacarose estéril intercalada com água destilada estéril para retirar o ácido acético remanescente na membrana do ovo. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar previamente limpos com

etanol 70% seguido de exposição à luz UV por 5 min. As pinças usadas para manipular o ovo foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 min.

Depois de preparados, os ovos foram colocados em meio mínimo para levedura na presença ou ausência de SFB 10% (v/v). O inóculo foi feito com alça calibrada para 20 µL a partir de um cultivo fresco e incubados a 30°C por cinco dias.

3.7.2. Ensaio empregando membrana sintética de nitrocelulose

Foram utilizadas membranas sintéticas de nitrocelulose (Millipore™) com três porosidades diferentes 8, 5 e 3 µm. As membranas foram colocadas diretamente em cima do meio de cultura YPD ou W/O sólidos, e ambos suplementados com 15% SFB, ou SFB puro. O inóculo, a partir de uma suspensão OD₆₀₀ de 1, foi feito na superfície da membrana oposta à superfície de contato com o meio de cultura. O período de incubação a 37°C foi de 2 dias.

3.7.3. Microscopia de contraste de fase e eletrônica de varredura

Depois do crescimento as membranas foram lavadas em AD para retirar o excesso de levedura e foram analisadas em um microscópio Leica DMBL. A microscopia eletrônica de varredura foi contratada junto ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP, ficando a cargo deste a parte de fixação, metalização, microscopia e documentação.

3.7.4. Avaliação da expressão gênica de alguns genes envolvidos na transição dimórfica

Avaliamos a expressão de 8 genes da família das adesinas ALS (Agglutinin-like sequence): ALS1, ALS2, ALS3, ALS4, ALS5, ALS6, ALS7, ALS9; bem como dos genes HWP1, ECE1 e CZF1.

O objetivo foi avaliar o padrão de expressão desses genes nos seguintes sistemas descritos no item 3.7.2 e ainda em caldo de W/O, YPD e SFB, sem a presença da membrana.

3.7.4.1 Extração do RNA total (Trizol) e síntese de cDNA

Fizemos extração de RNA total de células da *C. albicans* cultivadas em 3 mL dos caldos W/O, YPD e ambos suplementados com 15% SFB ou SFB puro. Colocamos o cultivo em tubos de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados em velocidade máxima em centrífuga de bancada, modelo Eppendorf 5415C, e em seguida o sobrenadante foi descartado. Para os sistemas com membrana, coletamos células do pólo do inóculo e do pólo oposto, em microtubos (tipo Eppendorf) separados; as membranas contendo as formas filamentosas foram acondicionadas em um terceiro tubo. Fizemos tal separação para todos os sistemas.

Em todos os tubos foram acrescentados 100 µL de pérolas de vidro (0,5 mm), 800 µL de Trizol (Invitrogen) e 200 µg de glicogênio. Procedemos à lise mecânica das formas leveduriformes e filamentosas em um Mini-BeadBeater™ (Biospec Products) em dois tempos de 1 min à velocidade máxima. A partir da lise, a extração do RNA total seguiu as instruções do fabricante e a integridade dos extratos foi avaliada em 1,5 % gel de agarose corada com brometo de etídio.

Os RNAs foram tratados com DNase RQ1 livre de RNase (Promega), e quantificados pelo método 260/280 nM em um espectrofotômetro U2001 Hitachi. Em seguida procedemos a uma amplificação via PCR (iniciadores Uni-F e Uni-R, Tabela 1) com os RNAs tratados para verificar a ausência de DNA contaminante. A síntese de cDNA fita simples foi realizada com o conjunto de

reagentes “High-Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystems™), conforme as instruções do fabricante.

3.7.4.2. Avaliação da eficiência dos iniciadores

Em geral os iniciadores utilizados nesta etapa já haviam sido descritos e validados anteriormente, entretanto, para alguns, fizemos modificações para ajustar o T_m idealmente para 60°C, diminuir interações do tipo *self-dimer* ou *heterodimer* e/ou estruturas secundárias que acabam por diminuir a eficiência da amplificação (Tabela 5).

A avaliação da concentração ideal de cada iniciador foi realizada verificando-se qual concentração fornecia o maior ΔR_n em um menor número de ciclos. As concentrações utilizadas são descritas na Tabela 6, depois de tal análise adotamos a concentração de 300 nM para todos os iniciadores.

Todas as análises foram feitas em um sistema de PCR em tempo real ABI 7300 (Applied Biosystems). O ajuste do aparelho permaneceu na configuração padrão e ao final de cada corrida adicionamos o estágio da curva de dissociação dos iniciadores, para avaliar a ocorrência de amplificação inespecífica e/ou dímeros.

3.7.4.3. Método do C_T comparativo com o sistema SYBR® Green

Optamos pelo método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$) com o sistema de detecção SYBR® Green (Invitrogen). As vantagens desse método são a capacidade de avaliar um maior número de condições por placa e a conseqüente redução do custo do ensaio. O cálculo da quantidade relativa é feito a partir de duas diferenças, a diferença entre a expressão do gene alvo e de um controle endógeno e a diferença entre o C_T da amostra de interesse e o C_T de uma amostra calibradora.

Tabela 5. Iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real

Nome	Sequência orientação 5' para 3'	Referência
ACT1 Forward*	TCATCTTCTGTATCAGAGGAACT	Modificado de Nailis et al. 2006
ACT1 Reverse*	ATGGGATGAATCATCAAACAAGAG	Nailis et al. 2006
RPP2B Forward*	TGCTTACTTATTGTTAGTTCAAGGT	Modificado de Nailis et al. 2006
RPP2B Reverse*	GCTTCAACACCAACGGATT	
TDH1 Forward*	GACGGTCCATCCCACAA	
TDH1 Reverse*	AGTGGAAGATGGGATAATGTTAC	
PMA1 Forward*	TTGCTTATGATAATGCTCCATACGA	Nailis et al. 2006
PMA1Reverse*	TACCCCAACAATCTTGCGAA	Modificado de Nailis et al. 2006
LSC2 Forward*	CGTCAACATCTTTGGTGGTAT	
LSC2 Reverse*	TGGTGGCAGCAATTAAACCT	
CPA1 Forward*	GGTGTGCTGCCATAACT	
CPA1Reverse*	TCTCCCAATGATGAACCTT	
IMH3 Forward*	TCATATGGCATTATTGGGTGGT	
IMH3 Reverse*	AACCATTTCTGCTTGTTCTTCA	
RIP Forward*	TGTCACGGTTCCCATTATGAT	
RIP Reverse*	TGGAATTTCCAAGTTCAATGGA	Nailis et al. 2006
RTALS1F	CTAGTGAACCAACAAATACCAGA	Modificado de Green et al. 2004
RTALS1R	CCAGAAGAAACAGCAGGTGA	Green et al. 2004
RTALS2F	CCAAGTATTAACAAAGTTTCAATCACT	Modificado de Green et al. 2004
RTALS2R	TCTCAATCTTAAATTGAACGGCTTAC	Green et al. 2004
RTALS3F	CCACTTCACAATCCCCATC	
RTALS3R	CAGTAGTAGTAACAGTAGTAGTTTCATC	Modificado de Green et al. 2004
RTALS4F	CCCAGTCTTTCACAAGCAGT	
RTALS4R	GTAAATGAGTCATCAACAGAAGCC	Green et al. 2004
RTALS5F ALT	TGACTACTTCCAGATTTATGCCA	Modificado de Green et al. 2004
RTALS5R ALT	GATACTGGTTATTATCTGAGGGAGA	
RTALS6F	CCACAATCATCTAGTAGCTTGGT	
RTALS6R2	TTGTCACATCATCTTTTGTTC	
RTALS7F	GAAGAGAACTAGCGTTTGGTCT	
RTALS7R2	TGGCATACTCCAATCATTTATTTCA	Green et al. 2004
RTALS9F2	CCATATTGAGAAACAAAGGGTTC	
RTALS9R2	AACTGAACTGCTGGATTTGG	
ECEFw	TCCGCAACATTCCACAAGTAATCCAA	Esse trabalho
ECE1127R	TGTGTCAACAGCTCTGACA	
HWPFW	CACAGGTAGACGGTCAAGG	
HWP1131R	GTGGGTAATCACAAGGCTCT	
CZF1378F	GGTTACCTAGCGGGTGA	
CZF1528R	CATCATGGCATTTTGCTCGT	

* Controles endógenos

Tabela 6. Concentrações utilizadas para avaliação da eficiência dos iniciadores

Iniciador anti-sense (nM)	Iniciador sense (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

A validação do ensaio foi realizada avaliando-se a eficiência da reação em todas as amostras de cDNA de interesse. Para tanto, fizemos três diluições (1x, 0,1x e 0,01x) das amostras e realizamos uma pré-corrida usando dois pares de iniciadores, ACT1 e LSC2 (Tabela 5).

Em todas as corridas usamos duplicatas com volume final ajustado para 10 µL, contendo 5 µL de 2X Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, 300 nM de cada iniciador, 0,2 µL ROX Reference Dye (500 nM concentração final), 1 µL do cDNA (aproximadamente 10 pg) e água ultrapura q.s.p.

A análise dos dados foi feita com o qBasePlus (Biogazelle), programa desenvolvido a partir do geNorm, um aplicativo para Excel, que determina os genes endógenos mais estáveis para a série de amostras testadas.

3.7.5. Imunoensaio para detecção das proteínas ECE1 e HWP1 na parede da hifa

O soro total de coelho, contendo os anticorpos policlonais obtidos a partir do fragmento N-terminal recombinantes das proteínas ECE1 e HWP1, foi testado contra o extrato total de formas filamentosas e leveduriformes. As formas filamentosas foram induzidas em caldo W/O 15% SFB, bem como pelo

sistema de membranas anteriormente descrito. Coletamos amostras das três frações do sistema, região do inóculo, membrana e caldo. As leveduras foram obtidas a partir do cultivo em caldo YPD.

3.7.5.1. Extrato total das formas filamentosas e leveduriformes

As amostras foram colocadas em microtubos (tipo Eppendorf) de 1,5 mL, a estas foram adicionados 1 mL do tampão de extração (5% BME, 50 mM NaF, 1 mM PMSF) e 100 µL de pérolas de vidro 0,5 mm. A lise ocorreu conforme descrito no item 3.7.4.1.

Os tubos foram centrifugados por 5 min 2500 *g*, 4°C. Em seguida, o sobrenadante (SBN1) foi transferido para outro tubo e o precipitado foi lavado 2 vezes com 1 mL do tampão de extração acrescido do detergente não iônico Triton X100, com centrifugação entre as lavagens e recuperação do sobrenadante (SBN2 e SBN3). O precipitado foi dissolvido em 500 µL do tampão contendo o detergente e as frações foram analisadas por SDS-PAGE.

3.7.5.2. Ensaio ELISA

O ensaio ELISA foi realizado sob orientação de pesquisadores do laboratório do Dr. Carlos Taborda, ICB, USP.

Para este ensaio usamos apenas o sobrenadante 2 e o precipitado final das células que cresceram no pólo do inóculo, membrana e superfícies de contato com o meio. Também amostramos células que foram cultivadas em YPD caldo. O teste piloto foi realizado em microplaca para ELISA de 96 poços, aplicando duplicatas de 50 µL por poço.

Uma curva de diluição com 6 pontos foi realizada com o fragmento N-terminal purificado da Hwp1 como segue: (1) 25 ng, (2) 12,5 ng, (3) 6,25 ng, (4) 3,2 ng, (5) 1,6 ng, (6) 0,8 ng/poço.

Em seguida a placa foi incubada por 1h a 37°C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi bloqueada com 200 µL de 1% BSA e incubada por 1h a 37°C. Passado esse período, a placa foi lavada 3 vezes em lavadora automática de placas (Auto Strip Washer, ELX50-Biotek Instruments Ink) com PBS-Tween (1X PBS, 0,05% Tween 20).

Cem microlitros do soro total de coelho diluído 1:100 em PBS foi colocado nos poços sensibilizados na etapa anterior e incubado a 37°C por 1 h. Em seguida a placa foi lavada novamente por 3 vezes. Adicionamos 50 µL do conjugado: anticorpo anti-IgG total de coelho biotinilado (1:1500) e enzima fosfatase alcalina ligada à estreptavidina (1:2500), seguido de incubação por 1 h a 37°C.

A placa foi lavada novamente por 5 vezes e em seguida foi acrescentado 50 µL do substrato p-NPP (ver preparo no item 3.1). A placa foi protegida com alumínio e incubada em temperatura ambiente por 30 min. A leitura foi feita no leitor de microplaca (Thermo Plate, DB9514F) a 405 nm. Os dados gerados foram analisados com o programa GraphPad Prism® versão 5.04 para Windows. Para o conjunto de dados o programa sugeriu a utilização do teste de variância ANOVA dois fatores.

3.8. Fracionamento do soro fetal bovino

Os ensaios de fracionamento do Soro Fetal Bovino (SFB) foram realizados em dois centros de pesquisa: no Instituto de Biociências (USP) sob orientação do Dr. Luis Eduardo Soares Netto, em aparelho ÄKTA™ FPLC™ com coletor de frações Frac-900 (GE Healthcare Life Sciences); ou em nosso laboratório em São José dos Campos, aparelho LCC-500 FPLC System com coletor de frações Frac-100 (Pharmacia).

3.8.1. Preparo das colunas e amostra a ser fracionada

Para dessalinização e/ou troca de tampões utilizamos a coluna PD-10 Desalting de 5 mL (GE Healthcare). A coluna foi preparada com 10 VC de água ultrapura e 5 VC de tampão 20 mM Tris-Cl pH 7,5. Depois de equilibrada, 2,5 mL do SFB foram colocados na coluna e eluídos com 5 mL do tampão usado para equilibrar a coluna.

Optamos por dois métodos de fracionamento, o primeiro empregou a coluna Mono QTM (GE Healthcare) cujo princípio se baseia na troca iônica onde concentrações crescentes do eluente promovem uma troca entre as moléculas adsorvidas na superfície da matriz conforme seu grau de afinidade.

A coluna Mono QTM foi lavada inicialmente com 10 VC de água ultrapura e equilibrada com 5 VC do tampão A (20 mM Tris-Cl, pH 7,5). Os 5 mL provenientes da etapa anterior (coluna PD-10) foram carregados na coluna e a eluição se deu em gradiente salino 0-100%, tampão B (1M NaCl, 20 mM Tris-Cl pH 7,5), 20 VC.

As frações foram monitoradas pelo monitor UV com filtro de 280 nm e foram sendo coletadas a cada 1 mL. As frações que continham picos foram usadas para os testes de cultura em presença do fungo para verificar quais mantinham atividade de indução da filamentação. Para esse teste, fizemos cultura em pequeno volume (1,5 mL): meio mínimo 2X acrescido das frações de interesse e ajuste do volume para atingir a concentração correta do meio mínimo (v/v). As frações que induziram a filamentação do fungo foram analisadas em SDS-PAGE.

O segundo método de fracionamento consistiu em usar as frações da etapa anterior com a atividade de interesse e fracioná-las novamente através

da coluna SuperoseTM 12 (Pharmacia). Nesse caso, a separação se dá pelo tamanho das moléculas e não por carga. A coluna foi lavada com 2 VC de água ultrapura e equilibrada com 2 VC do tampão A. Em seguida, 200 µL da fração de interesse foi carregada na coluna e eluída com o tampão A, 1,2 VC. As frações que continham picos foram usadas para os testes de cultura em presença do fungo para verificar quais mantinham atividade de indução da filamentação. Para esse teste, fizemos cultura em pequeno volume (1,5 mL): meio mínimo 2X acrescido das frações de interesse (v/v) para a concentração 1 x do meio mínimo. Estas mesmas frações foram analisadas por SDS-PAGE.

IV. Resultados

4.1. Extração de DNA em microplaca

O desenvolvimento do protocolo de extração foi dividido em 4 partes: (1) estabelecer o melhor sistema de inóculo; (2) o tampão de lise mais adequado para as condições de microvolume e quantidade de massa celular existente; (3) estabelecer a melhor maneira de purificação examinando a quantidade de proteína remanescente; e (4) qual a forma de recuperação do DNA total mais eficiente.

Para o inóculo a condição mais adequada foi 150 μ L do meio YPD 0,001% v/v Tween 20. Na variação sem o detergente houve a formação de uma espessa camada de fungo na superfície, dificultando toda a manipulação posterior ocasionando no descarte da placa. A opção em meio sólido gera um resultado heterogêneo na quantidade de DNA extraído devido ao carregamento irregular de células a partir do meio base para a solução de lise.

Testamos as soluções de lise em dois fungos diferentes, *Geotrichum capitatum*, um leveduriforme que também apresenta a forma filamentosa (Fig. 1B), e *Candida krusei*, uma levedura frequentemente isolada do hospedeiro humano, que possui uma consistência seca e aspecto rugoso (Fig. 1C). Para verificar se havia possíveis inibidores que comprometessem a utilização posterior do DNA bem como se a massa total extraída era suficiente para o nosso propósito realizamos uma PCR com os iniciadores ITS1/Uni-R (Fig. 1A).

Figura 1. Resultado de diferentes condições de extração de DNA. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Em **A**, PCR. 1 Padrão de tamanho de bandas; 2, controle sem *template* (NTC); 3, Controle positivo; De 4 a 8, amplificações a partir de produtos de extração de *G. capitatum* e de 9 a 13 a partir de *C. krusei*: 4 e 9 - fervura em água; 5 e 10 – 1% SDS; 6 e 11 – 25mM DTT, 1% SDS; 7 e 12 – Zymolyase, 1% SDS; 8 e 13 – Zymolyase, 25 mM DTT, 1% SDS. Também são mostradas as extrações de *G. capitatum* em **B** e *C. krusei* em **C**: 1 e 2, fervura em água; 3 e 4, 1% SDS; 5 e 6, 25 mM DTT, 1% SDS; 7 e 8, Zymolyase, 1% SDS; e 9 e 10, Zymolyase, 25 mM DTT, 1% SDS. Números ímpares, precipitação apenas com Isopropanol, números pares, precipitação com acrilamida linear como carreador, acetato de sódio e etanol absoluto.

A lise por fervura em água de fungos como *C. albicans* e espécies proximamente relacionadas já foi relatada na literatura (Donnelly et al., 1999;

Mänhnb et al., 2001; Liguori et al., 2009), entretanto como pode ser observado é pouco eficiente para fungos com aparências menos cremosa (Fig. 1B e 1C, duplicadas 1 e 2). A PCR foi positiva para todos os outros métodos de lise (Fig. 1A), entretanto, resolvemos adotar como padrão, o tampão de lise: 100 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH7,5, 25 mM DTT, 1 M sorbitol, Zymolyase® 165 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pois esse pode ser usado em uma maior variedade de fungos cuja consistência dificulta a extração (Fig. 1B e 1C, duplicatas 9 e 10).

O tratamento com diferentes concentrações de acetato de potássio mostrou que não há diferença para as concentrações variando de 1,5 M a 2,5 M para remoção de proteínas (Fig. 2), entretanto, mantivemos a concentração 2,5 M, para assegurar a máxima remoção de SDS presente no tampão de lise.

Figura 2. Demonstração da remoção de proteínas. Eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS corado com comassie blue. Preparação de DNA total tratada com diferentes concentrações de acetato de potássio e corada para revelar proteínas. Cada linha contém 10 μL da solução previamente tratada com diferentes concentrações finais de KOAc. (1) sem amostra; (2) 2,5 M; (3) 2 M; (4) 1,5 M; (5) 1 M; (6) 0,5 M; (7) 0,25 M; (8) 50 mM; (9) amostra sem tratamento; (10) apenas tampão de corrida.

Não encontramos diferenças significativas entre os diferentes tipos de precipitação e recuperação do DNA total e adotamos o mais simples que é a

adição de isopropanol apenas (Fig. 1B e 1C, números ímpares). Entretanto, para recuperação de fragmentos pequenos verificamos que a adição do carregador e sal é fundamental na recuperação do ácido nucléico (Fig. 3).

Figura 3. Análise da recuperação do DNA após extração. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Nesse painel é mostrada eficiência da recuperação do DNA total extraído e DNA plasmidial após diferentes condições de precipitação. Em **A** e **B** foram aplicados 5 μ L de 30 μ L de DNA extraído de *C. krusei*; em **C** e **D**, volume total da solução contendo o DNA plasmidial recuperado. **A** e **C** todas as amostras tratadas com isopropanol, **B** e **D** todas as amostras tratadas com etanol absoluto; As amostras foram aplicadas ao gel em duplicata. **I**, sem sal ou carregador, apenas Isopropanol; **E**, sem sal ou carregador, apenas etanol absoluto; (2) 20 μ g de Acrilamida; (3) 125 mM NaOAc; (4) 20 μ g de Acrilamida, 125 mM NaOAc; (5) 125 mM NaCl; (6) 20 μ g de Acrilamida, 125 mM NaCl. (7, 8 e 9) padrão de massa, 20 ng, 60 ng e 100 ng respectivamente.

4.2. Método PCR-RFLP

4.2.1 Análise *in silico* das seqüências de interesse

Um total de 141 seqüências depositadas em diversos bancos de sequencias nucleotídicas foi analisado nessa etapa do trabalho. Com exceção de poucas espécies, como *C. albicans*, que já possuíam na época da análise toda a região do DNA ribossomal seqüenciada, foi necessário buscar nos bancos as seqüências do 18S, ITS1-5,8S-ITS2 e 28S, separadamente e montar, *in silico*, a região do cistron ribossomal de interesse. Entretanto, ainda foi necessário seqüenciar a região completa para seis espécies que não tinham dados suficientes publicados e duas confirmaram ser espécies novas. As seqüências de três espécies foram depositadas no GenBank, e já estão disponíveis para consulta pública sob os números de acesso: *Candida rugosa*, ATCC 10571 GU144663.1, *Candida* sp. SK75, GQ176145, e *Candida pararugosa* GQ139517.1 (ANEXO I). Uma quarta seqüencia já está depositada no banco, sob o número provisório “bankit1225299” e será liberada para consulta pública depois da publicação do artigo que a descreve. Para as outras duas espécies, *Endomelanconiopsis endophytica* e *Exophiala dermatitides* ainda falta fazer o depósito das seqüencias. De forma representativa, a Figura 4 ilustra essa parte do processo que foi repetida para todas as espécies estudadas até o momento.

Uma vez montada a região de interesse, procedemos à predição do padrão de restrição com a enzima *Ddel*. Com base nos mapas, montamos tabelas com o padrão de tamanho de bandas esperadas para cada espécie (Fig. 5). Devido à importância dessas tabelas para o processo de identificação, um guia de utilização dos padrões e tabelas foi submetido junto com o artigo para a publicação (ANEXO V.I.: *Pattern Identification Guide*).

Figura 4. Primeira etapa da análise *in silico* de parte do cistron ribossomal de *C. albicans*. A, o esquema representa região de interesse. As dimensões não estão em escala. As cores foram usadas em correspondência com a parte inferior da figura (B). O retângulo preto em A e letras pretas em B correspondem ao 18S; em vermelho, ITS1, 5,8S e ITS2, e em azul, região D1/D2 do 28S. A região dos iniciadores está sinalizada com caixas em azul e vermelho. Número de acesso da sequência: NW139715.1 (GenBank).

Figura 5. Comparação *in silico* entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*. A, mapas de restrição gerados pela ferramenta MapDrawTM, ajustado para o filtro da enzima *DdeI*, alimentado com as seqüências de *C. dubliniensis* **A1** e *C. albicans* **A2**; As barras verticais representam a posição do sítio de restrição com e o filtro utilizado, os números próximos de cada sítio foram usados para facilitar a correspondência com as tabelas em **B**, onde são mostrados o número de sítio de restrição, o número de fragmentos esperados, a posição de início e fim de cada sítio, o tamanho provável de cada sítio e na terceira coluna, o arranjo dos fragmentos por tamanho em pares de base, do maior para o menor.

4.2.2. Validação *in vitro* dos padrões previstos para a enzima *DdeI*

4.2.2.1. PCR

Inicialmente utilizamos os iniciadores 18SFw e Uni-R (Tabela 1), esse par já é bastante referenciado na literatura e resolveu bem para quase todas as espécies testadas nesse trabalho. O tamanho médio dos amplicons variaram entre 2464 bp para *G. capitatum* a 3966 bp para *E. dermatitides*, mas a média

da maioria das espécies esteve em torno de 2800 bp. Entretanto, não foi possível amplificar para *M. gypseum* e um a eficiência para *P. brasiliensis* foi baixa. Um alinhamento entre a seqüência dessas duas espécies e *C. albicans*, revelou pouca diferença entre as sequencias, mas de alguma maneira essas variações podem estar diminuindo a eficiência da reação (Fig. 6).

```

Iniciador 18SFw  AACCTGGTTGATCCTGCCAGT
C. albicans      TATCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCA
P. brasiliensis TACCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCA
M. gypseum      TATCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCA
                  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 6. Alinhamento múltiplo entre *C. albicans*, *P. brasiliensis* e *M. gypseum* realizado com o ClustalX. Apenas a região inicial do rDNA 18S é representada aqui. Os asteriscos marcam as bases que não variam entre as 3 espécies. Destacamos em vermelho as bases que variam na região alvo do iniciador. Inserimos manualmente a sequência do iniciador 18SFw como referência para a posição das divergências.

C. albicans apresenta 2 *mismatches* na extremidade 5' do iniciador, *P. brasiliensis* também apresenta 2 *mismatches*, um na primeira base do iniciador e outro na posição 13. *M. gypseum* é o que apresenta o maior número de divergências, 3, duas no início, similar a *C. albicans* e uma na base 13, similar a *P. brasiliensis*.

Para superar tal limitação fizemos um alinhamento múltiplo com 32 sequências estudadas, buscando uma melhor região para o desenho de novos iniciadores. Encontramos duas regiões com bom potencial e desenhamos dois pares, um com uma degeneração e outro sem degeneração (Fig. 7). Ambos funcionaram bem, sendo o segundo mais eficiente e foi adotado no protocolo padrão do método (Fig. 8).

Figura 7. Alinhamento múltiplo de 32 sequências das espécies estudadas.

O alinhamento múltiplo foi feito com o programa ClustalX. Alimentamos o programa BioEdit Sequence Aligmnt Editor com o arquivo da sequência para facilitar a visualização das regiões idênticas, sequência consenso. Abaixo da sequência consenso introduzimos manualmente a sequência dos dois indicadores, 18S Fw1 e 18S Fw2.

Adotamos o uso do “kit” GoTaq® DNA Polymerase (Promega) para as reações de amplificação, entretanto enzimas de outros fabricantes foram testadas como a Taq DNA Polymerase da Fermentas Life Science e a Taq DNA Polymerase da LGC Biotecnologia e tiveram resultados semelhantes.

Figura 8. Imagem representativa dos amplicons obtidos para as 33 espécies estudadas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os números em parênteses representam o tamanho esperado para o amplicon de cada espécie. L, 1Kb DNA Marker (Axygen). 1, *G. capitatum* (2464 bp); 2, *C. lipolytica* (2508 bp); 3, *Candida* sp. L96D (2593 bp); 4, *Candida* sp. SK75 (2601 bp); 5, *C. rugosa* (2595 bp); 6, *C. intermedia* (2647 bp); 7, *C. stellata* (2662 bp); 8 *C. lusitaniae* (2631 bp); 9, *C. pararugosa* (2679 bp); 10, *C. inconspicua* (2767 bp); 11, *C. krusei* (2804 bp); 12, *P. norvegensis* (2812 bp); 13, *C. parapsilosis* (2841 bp); 14, *C. tropicalis* (2843 bp); 15, *C. albicans* (2858 bp); 16, *C. dubliniensis* (2860 bp); 17, *T. mucoides* (2889 bp); 18, *T. inkin* (2901 bp); 19, *E. endophytica* (2918); 20, *P. guilliermondii* (2944 bp); 21, *P. anomala* (2951 bp); 22, *M. gypseum* (2953 bp); 23, *C. zeylanoides* (2960 bp); 24, *P. subpelliculosa* (2965 bp); 25, *C. palmioleophila* (2981 bp); 26, *D. hansenii* (2975 bp); 27, *P. brasiliensis* (2986 bp); 28, *C. thermofila* (3064 bp); 29, *T. asahii* (2904 bp); 30, *C. kefir* (3027 bp); 31, *S. cerevisiae* (3175 bp); 32, *C. glabrata* (3224 bp); 33, *E. dermatitides* (3966 bp).

4.2.2.2. Digestão com a enzima *Ddel*

A enzima *Ddel* apresentou um grande potencial de diferenciação. Ela reconhece o palíndromo de 5 bases, CTNAG, aceitando uma variação de qualquer base na posição 3 da sequência. Outra versatilidade da enzima é que cliva bem em qualquer tampão testado, exibe excelente estabilidade no armazenamento, tendo uma eficiência mínima de 75% segundo o manual do fabricante.

Uma recomendação do fabricante é a purificação do DNA antes da digestão e a utilização de um tampão apropriado. Como a *Ddel* tem uma boa eficiência com diferentes tampões, testamos se ela seria eficiente quando aplicada diretamente na mistura da PCR contendo os amplicons. Eliminar uma etapa no processo significa ganho de tempo e redução de custos. A enzima manteve a eficiência sem a necessidade de purificação ou adição de um tampão adicional (Fig. 9).

Para verificar a qualidade dos resultados com enzimas de outros fabricantes ou lotes diferentes, fizemos uma digestão com massas iguais de um mesmo produto de amplificação e confirmamos que o padrão se manteve (Fig. 9). As enzimas dos fornecedores Pharmacia (linhas 1 e 2), BRL (linhas 3 e 4) e NEB (5 e 6) já estavam vencidas há mais de 10 anos (armazenadas a -80°C), mas mantiveram a capacidade de clivagem, uma vez que a quantidade de DNA não digerido é praticamente imperceptível quando comparado com a enzima na vigência da validade (linhas 7 e 8).

A digestão foi incubada inicialmente por 2h e em virtude dos excelentes resultados obtidos, adotou-se a incubação por 4h usando-se apenas duas unidades da enzima, reduzindo de forma significativa o custo do método.

Figura 9. Digestão com diferentes tampões de incubação. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Digestão em presença ou ausência do tampão recomenda. Em 1e 2 *Ddel* Pharmacia; 3 e 4 *Ddel* BRL; 5 e 6 *Ddel* vencida NEB; 7 e 8 *Ddel* na validade NEB. Números ímpares, digestão na presença do tampão NEB 3 1X. Números pares, sem tampão, a enzima foi adicionada diretamente ao produto da PCR.

4.2.2.3. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é uma etapa fundamental para a correta identificação da amostra. Optamos por um gel mais concentrado (2%) o que aumenta a capacidade de discriminação principalmente para fragmentos com tamanho inferior a 500 bp. O teste com o gel comercial não rendeu bons resultados, pois ele não resolve satisfatoriamente bandas menores que 300 bp

e apresenta uma leve distorção para as trilhas do centro do gel, o que dificulta a comparação dos padrões.

4.2.2.4. Validação e abrangência do método

As cepas usadas para estabelecer os padrões da RFLP foram preferencialmente ATCC. Para algumas espécies, quando não tínhamos a cepa ATCC, seqüenciamos toda a região de interesse para garantir que cada padrão corresponda a uma sequência e uma espécie. Os padrões obtidos pela RFLP foram comparados com aqueles da previsão *in silico* e todos confirmaram o que havia sido previsto. Trinta e três padrões foram validados até o momento (Fig. 10), o que corresponde à possibilidade de identificação de 33 espécies fúngicas (Tabela 7).

Depois da confirmação dos padrões, iniciamos um processo de comparação com alguns métodos de identificação muito bem estabelecidos entre os quais, dois aceitos como padrão ouro das categorias: molecular (seqüenciamento) e bioquímico (API). Quatrocentas e quarenta e uma amostras já foram identificadas pelo método PCR-RFLP e os resultados foram comparados entre as diferentes metodologias de identificação (ANEXO III).

Entretanto, a abrangência deve ser superior aos 33 padrões apresentados. Uma análise *in silico* com seqüências disponíveis para espécies de outros gêneros, famílias, ordens, classes e até filos, mostrou que em todas elas existem os sítios complementares aos iniciadores e que os amplicons resultantes geram padrões diferentes e únicos quando digeridos pela *DdeI* (ANEXO II).

Figura 10. Padrões identificados nesse estudo. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Os trinta e três padrões obtidos pelo método PCR-RFLP estão representados aqui. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™). 1, *C. metarugosa*; 2, *C. rugosa*; 3, *P. guilliermondii*; 4, *C. lusitaniae*; 5, *G. capitatum*; 6, *C. stellata*; 7, *C. mesorugosa*; 8, *T. mucoides*; 9, *C. lipolytica*; 10, *C. albicans*; 11, *C. dubliniensis*; 12, *C. tropicalis*; 13, *P. anomala*; 14, *D. hansenii*; 15, *C. intermedia*; 16, *C. thermofila*; 17, *P. norvegensis*; 18, *P. subpelliculosa*; 19, *E. endophytica*; 20, *C. parapsilosis*; 21, *C. kefyr*; 22, *C. krusei*; 23, *M. gypseum*; 24, *C. palmiophila*; 25, *C. zeylanoides*; 26, *P. brasiliensis*; 27, *C. inconspicua*; 28, *S. cerevisiae*; 29, *C. glabrata*; 30, *T. inkin*; 31, *T. asahii*; 32, *C. pararugosa*; 33, *E. dermatitides*.

Tabela 7. Espécies identificadas pelo método PCR-RFLP

Número	Espécie
1	<i>Candida albicans</i>
2	<i>Candida dubliniensis</i>
3	<i>Candida glabrata</i>
4	<i>Candida inconspicua</i>
5	<i>Candida intermedia</i>
6	<i>Candida kefyr</i>
7	<i>Candida krusei</i>
8	<i>Candida lipolytica</i>
9	<i>Candida lusitaniae</i>
10	<i>Candida</i> sp. L96D
11	<i>Candida</i> sp. SK75
12	<i>Candida norvegensis</i>
13	<i>Candida palmioleophila</i>
14	<i>Candida parapsilosis</i>
15	<i>Candida pararugosa</i>
16	<i>Candida rugosa</i>
17	<i>Candida stellata</i>
18	<i>Candida thermophila</i>
19	<i>Candida tropicalis</i>
20	<i>Candida zeylanoides</i>
21	<i>Debaryomyces hansenii</i>
22	<i>Exophiala dermatitides</i>
23	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>
24	<i>Geotrichum capitatum</i>
25	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
26	<i>Pichia guilliermondii</i>
27	<i>Pichia subpelliculosa</i>
28	<i>Pichia anomala</i>
29	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
30	<i>Trichosporon asahii</i>
31	<i>Trichosporum inkin</i>
32	<i>Trichosporum mucoides</i>
33	<i>Mycrosporum gypseum</i>

Tínhamos inicialmente uma promessa de colaboração com o Laboratório bioMérieux por intermédio do representante brasileiro segundo a qual eles nos forneceriam as amostras a serem usadas para a validação do método. Solicitamos aproximadamente 50 cepas, todas descritas como identificáveis pelo método API 20C AUX. Pretendíamos reidentificá-las pelo método API, PCR-RFLP, e o seqüenciamento da região D1/D2 do 28S rDNA.

A colaboração não ocorreu e a alternativa foi buscar amostras em outras instituições que pudessem ser usadas na validação. O retorno dos novos colaboradores superou em 850% a expectativa, pois o número de amostras identificadas chegou a 441.

Além de uma micoteca própria, com todas as espécies identificadas por seqüenciamento, recebemos várias bibliotecas com identificações pelos métodos clássicos ou API, e 10 cepas ATCC com identificação certificada pela FioCruz. Entretanto, não seria possível, por questões de custo e tempo, fazer a identificação por API, RFLP e seqüenciamento de todas as amostras conforme o plano inicial. A alternativa foi identificar por RFLP todas as amostras e usar o seqüenciamento apenas se houvesse divergência entre os métodos.

Trezentas e oitenta e uma espécies foram identificadas pelo sistema API das quais 92.4% foram confirmadas pela PCR-RFLP. Vinte e nove isolados foram identificados incorretamente e um não pode ser identificado (Tabela 8). As principais limitações foram (1) a impossibilidade de identificar *E. dermatitides* e *C. lipolytica*; (2) discriminar entre *C. krusei* e *C. inconspicua*, *C. famata* e *C. palmioleophila*, *C. pelliculosa* e *C. subpelliculosa*, *C. rugosa*, *C. pararugosa* e outras duas novas variantes, *Candida* sp. SK75 e *Candida* sp. L96D, que apresentam padrões bioquímicos parecidos, mas características morfológicas diferentes, divergindo também na análise molecular do DNA.

O teste API prevê em alguns casos de baixa discriminação uma prova complementar de microcultivo onde a filamentação ou não do fungo serve de fator discriminante entre as cepas estudadas. A Tabela 9 relaciona a primeira identificação (leitura de 72 h), a segunda identificação, correspondente à identificação após o teste complementar de microcultivo e a RFLP.

Tabela 8. Espécies testadas com o API 20C AUX

Espécies	ID correta n=	Teste complementar n=	ID incorreta n=	Total n=	ID Correta %
<i>Candida glabrata</i>	23	-	0	23	100
<i>Trichosporon inkin</i>	4	-	0	4	100
<i>Pichia norvegensis</i>	3	-	0	3	100
<i>Trichosporon asahii</i>	2	-	0	2	100
<i>Candida albicans</i>	204	10	2	216	99.1
<i>Pichia guilliermondii</i>	6	11	1	18	94.4
<i>Candida dubliniensis</i>	14	-	1	15	93.3
<i>Candida krusei</i>	10	-	1	11	90.9
<i>Candida parapsilosis</i>	28	-	4	32	87.5
<i>Candida tropicalis</i>	28	5	5	38	86.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	-	1	5	80
<i>Candida pararugosa</i> *	0	-	4	4	0
<i>Candida pelliculosa</i>	0	-	2	2	0
<i>Candida</i> sp. SK75*	0	-	2	2	0
<i>Candida kefir</i>	0	-	1	1	0
<i>Candida lipolytica</i> *	0	-	1	1	0
<i>Candida</i> sp. L96D*	0	-	1	1	0
<i>Exophiala dermatitides</i> *	0	-	1	1	0
<i>Geotrichum capitatum</i>	0	-	1	1	0
<i>Ogathaea thermophila</i> *	0	-	1	1	0
Total	326	26	29	381	92.4

* Espécies que não estão na base de dados do sistema API.

A necessidade do microcultivo foi mais freqüente entre os isolados identificados como *C. famata* (*D. hansenii*) e refutou a primeira identificação, resultando em *C. albicans*, *C. tropicalis* ou *P. guilliermondii*.

A discriminação entre *C. famata* e *C. palmioleophila* é difícil mesmo através do seqüenciamento do cistron ribossomal, a similaridade entre o 18S é de 98%, sendo que longos trechos do amplicon, tem similaridade de 100%. A cepa *C. famata* ATCC 40135, obtida junto ao INCQS Fio Cruz exemplifica bem essa problemática, pois se trata de *C. palmioleophila*. A diferença foi inicialmente observada com a RFLP e confirmada pelo seqüenciamento da região ITS 2 (Fig. 10, trilhas 14 e 24).

Tabela 9. Uso do teste complementar para identificação dos isolados

Nº	Amostra	Primeira identificação API	Segunda identificação Teste complementar	RFLP
1	11 ANBN C	<i>C. famata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
2	21 ANBN E	<i>C. famata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
3	21 ANBN F	<i>C. famata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
4	26 ANBN F	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
5	37 ANBN A	<i>C. famata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
6	46 ANBN B	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
7	46 ANBN C	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
8	49 ANBN B	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
9	50 ANBN A	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
10	07 CT D	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11	12 CT B	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
12	19 CT C	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
13	28 CT B	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
14	UNESP 1A	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
15	UNESP 1B	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
16	UNESP 1C	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
17	UNESP 1D	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
18	UNESP 4.A	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
19	UNESP 4.B	<i>C. famata</i> <i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>C. parapsilosis</i>
20	UNESP 6A	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
21	UNESP 6B	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
21	UNESP 6C	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
23	UNESP 7A	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
24	UNESP 7C	<i>C. dubliniensis</i> <i>C. albicans</i> 1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
25	FCF 14,1	<i>C. tropicalis</i> <i>C. albicans</i> 1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
26	LGMG4B	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
27	LGMG4E	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
28	LGMG7B	<i>C. tropicalis</i> <i>C. neoformans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
29	FCF 426	<i>C. lusitaniae</i> <i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>

4.3. Identificação e diferenciação de *P. guilliermondii*, *C. palmioleophila* e *D. hansenii* por PCR em Tempo Real

Dentre as três regiões analisadas do cistron ribossomal, ITS1, ITS2 e D1/D2 do 28S, apenas ITS 1 ofereceu condições satisfatórias para o desenho do ensaio. Essa região é flanqueada por dois domínios conservados: a região 3' do 18S e 5' do 5.8S; o amplicon é pequeno (no máximo 300 bp) e a sequência é polimórfica entre espécies diferentes, mas conservada entre linhagens de uma mesma espécie.

Com o alinhamento múltiplo foi possível escolher uma região satisfatória para o desenho dos iniciadores e sondas (Fig. 11). Dentre as possibilidades do sistema de detecção, para o objetivo de genotipagem, idealmente, usa-se o sistema TaqMan®. Optamos pelas sondas TaqMan MGB (Minor Groove Binder), pois além de possuir um *quencher* não-fluorescente o que aumenta o sinal do corante repórter, emprega bases modificadas com o intuito de promover um incremento no T_m, assim, é possível se obter um T_m em torno de 70°C, sem aumentar a sequência da sonda.

O gráfico que representa a emissão de fluorescência do repórter normalizado em função do ciclo do ensaio *singleplex*, onde cada sonda foi testada separadamente contra os DNAs das três espécies, mostra claramente a especificidade sonda/alvo do ensaio (Fig.12).

Outros testes como (1) ensaio *multiplex*, alimentado com os DNAs das três espécies separadamente (Fig. 13A); (2) ensaio *multiplex* contra a mistura de DNAs das três espécies (Fig. 13B); e (3) a reação *singleplex* contra uma mistura de DNAs das três espécies (Fig. 13C), também foram realizados e apresentaram bons resultados.

Figura 11. Alinhamento múltiplo das seqüências na região polimórfica ITS1. Uma seqüência representativa da região ITS1 para as três espécies foi usada no alinhamento múltiplo com o programa ClustalX. Os números representam a posição das bases, as caixas em cinza correspondem ao alvo dos iniciadores e as caixas sem preenchimento correspondem ao alvo das sondas.

Figura 12. Amplificação do ensaio de PCR em Tempo Real monitorada por sondas TaqMan® MGB. A, B e C: Gráficos das amplificação apresentando ΔRn em função do ciclo para *P. guilliermondii*, *D. hansenii* e *C. palmioleophila*, respectivamente. **NTC** (*no template control*) corresponde à região *Background* mostrando a amplificação negativa para o controle sem template e para as combinações não específicas entre sonda/template.

Figura 13. Amplificação do ensaio de PCR em Tempo Real monitorada por sondas TaqMan[®] MGB. O teste verificou a eficiência do ensaio em três situações: **A**, *multiplex*, alimentado com os DNAs das três espécies separadamente; **B**, *multiplex* contra a mistura de DNAs das três espécies; **C**, reação *singleplex* contra uma mistura de DNAs das três espécies.

4.4. Identificação e diferenciação de *C. rugosa*, *C. pararugosa*, e duas novas espécies, *Candida* sp. L96D e *Candida* sp. SK 75 por PCR em Tempo Real

4.4.1 Caracterização Morfológica: Macro e Microscópica

Em ChromAgar *Candida* com 5 dias de cultivo, as colônias da cepa *C. rugosa* ATCC 10571 apresentaram superfície rugosa e cor verde claro. Os isolados SK 75/76 e L96D foram semelhantes, colônias com uma superfície lisa, verde ao centro e contorno em creme. *C. pararugosa* teve colônia cor violeta claro e superfície lisa (Fig. 14).

Em YPD, depois de 72 h de crescimento a 30°C, a cepa *C. rugosa* ATCC 10571 exibiu uma colônia com coloração creme, opaca com aspecto rugoso e seco, similar aos isolados SK 75/76. *Candida* sp. L96D e *C.*

pararugosa BMM 30D no entanto apresentaram colônias cremosas, lisas, e brilhantes, também com coloração creme. Depois de 10 dias, *C. rugosa* apresentou uma superfície ainda mais áspera, os isolados SK75/76 apresentaram uma superfície claramente diferente de todas as outras, um aspecto bastante enrugado com superfícies que se projetam a partir da colônia formando um relevo irregular. *C. pararugosa* apresentou colônias brancas com uma discreta rugosidade e *Candida* sp. L96D alterou o aspecto brilhante para opaco (Fig. 15).

Figura 14. Aspectos macroscópicos em CHROMagar™ *Candida*. Registro após 5 dias de cultivo. Em **A**, *C. rugosa*; **B**, isolados SK 75/76; **C**, *C. pararugosa*; **D**, isolado L96D.

O cultivo em diferentes temperaturas mostrou que *C. pararugosa* cresce mais lentamente que todas as outras espécies, independente da condição e apenas o isolado L96D é tolerante à temperatura de 45°C (Fig. 16 linha D).

Figura 15. Aspectos macroscópicos em YPD com 10 dias de cultivo a 30°C. Os aspectos macroscópicos das colônias **A**, *C. rugosa*; **B**, isolados SK 75/76; **C**, *C. pararugosa*; **D**, isolado L96D, são mostrados em 4 diluições diferentes: da esquerda para direita, 1000X, 100X, 10X e OD600 1.

Figura 16. Teste de tolerância do cultivo em diferentes temperaturas após 72 h. Nos dois paines, esquerdo e direito, a disposição das espécies e a ordem do inóculo em função da diluição é a mesma: *C. rugosa* **A**; isolados SK 75/76 **B**; *C. pararugosa* **C**; e o isolado L96D **D**. As diluições são, da esquerda para direita: 1000X, 100X, 10X e OD600 1.

A avaliação microscópica revelou leveduras gram-positivas, com pequenas variações de forma, de oval a alongadas. Todos os isolados foram positivos para a prova de tubo germinativo e clamidósporo negativo em microcultivo, no entanto, a observação de microcultivo em lâmina mostrou diversos arranjos de hifas. A cepa ATCC 10571 apresentou abundância de hifas alongadas em toda a lâmina (Fig. 16); hifas curtas que formam colônias satélite com forma de aranha ao longo da estria de crescimento foram vistas em *C. pararugosa* (Fig. 15); SK 75/76 mostraram um predomínio de leveduras com hifas apenas nas bordas da linha de crescimento (Fig. 6 15) e de aparência semelhante foi observado para L96D, porém, com leveduras entre as hifas (15).

4.4.2. Caracterização Bioquímica: fermentação e assimilação

As amostras foram submetidas ao teste de fermentação de carboidratos, com os seguintes açúcares: dextrose, maltose, lactose, galactose e sacarose. ATCC 10571 e SK 75/76 fermentaram somente glicose; *C. pararugosa* e L96 D não fermentaram nenhum destes açúcares.

No teste de assimilação realizado com o sistema API, *C. pararugosa* assimilou dextrose, galactose, glicerol, rafinose, xilitol e xilose (Código API: 6460004). O isolado L96D assimilou dextrose, glicerol, xilose, galactose, sorbitol e N-Acetil-Glucosamine NAG (Código API: 64421004). O isolado SK75 teve o padrão de assimilação muito parecido com o isolado L96D, a única diferença é que não assimilou glicerol (Código API: 24421004). *C. rugosa* também teve um padrão similar aos dois anteriores, porém essa além do glicerol, também não assimilou xilose (Código API: 2042104).

Figura 17. Características microscópicas reveladas pela coloração Gram e Microcultivo. O painel foi montado em colunas, cada coluna corresponde a uma espécie. Em **A**, *C. rugosa*; **B**, *C. pararugosa*; isolados **C**, SK 75/76; **D**, isolado L96D. A aba lateral indica os testes: Gram e Microcultivo.

4.4.3. Perfil de susceptibilidade a antifúngicos

O perfil de susceptibilidade *in vitro* mostrou que para Anfotericina B, *C. rugosa*, isolados SK 75/76 e *C. pararugosa* apresentaram CIM = 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e o isolado L96D apresentou CIM = 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para 5-fluorocitosina, apenas *C. pararugosa* obteve CIM = 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, os outros isolados apresentaram CIM = 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Quanto ao cetoconazol, *C. rugosa* teve CIM = 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, SK 75/76 apresentou CIM = 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ enquanto que L96D e *C. pararugosa* CIM

= 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores para fluconazol foram de CIM = 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. rugosa*, CIM = 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para SK75/76, CIM = 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para L96D e de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. pararugosa*.

4.4.4. Caracterização molecular e filogenética

Inicialmente, a busca por seqüências nos bancos de dados nos forneceu seqüências curtas para essas espécies, geralmente da região ITS ou 28S. *C. rugosa* era a única com a seqüência parcial do 18S e ainda assim os dois registros encontrados, AB013502 e EF371020, diferiam. O BLAST entre essas duas seqüências mostrou uma identidade de 97% (1638/1672 bp) o que é baixa por ser uma região conservada. Ambas as seqüências não foram obtidas de cepas padrão e também não havia referências quanto à qualidade do seqüenciamento e resolvemos então seqüenciar toda a região de interesse para prosseguir com o estudo.

O seqüenciamento completo de toda a região para o estudo da RFLP nos forneceu informações precisas quanto o tamanho do amplicon, posição dos sítios de restrição para a *DdeI* bem como polimorfismos de tamanho e de seqüência. *C. pararugosa*, por exemplo, tem um amplicon de 2704 bp, maior que o de *C. rugosa* (2629 bp), SK75/76 (2629 bp) e L96D (2622 bp), valores esses referentes à amplificação com os iniciadores 18SFw e Uni-R.

Para evidenciar o polimorfismo de tamanho entre *C. pararugosa* e as demais espécies, uma reação com os iniciadores ITS1 e Uni-R foi realizada. É na região ITS/5.8S/ITS2 e D1/D2 do 28S que há o maior número de inserções no cistron de *C. pararugosa*, aproximadamente 15 e 60 bases respectivamente. A diferença entre os tamanhos pode ser facilmente visualizada em gel de agarose (Fig. 18). Outro dado importante é que a digestão *in silico* com a

enzima *DdeI* (ANEXO V.I.; Tabelas 23, 24, 25, 26), teve o seu padrão confirmando pela RFLP.

Figura 18. Tamanho de amplicons. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Nesse ensaio é demonstrado o polimorfismo de tamanho entre *C. pararugosa* linhas 5 e 6 e as demais espécies: 1, L96D, 2, *C. rugosa*, 3, SK75 e 4, SK76. L, “GeneRuler™ 100 bp DNALadder” 100-1000 bp SM0241 (Fermentas). N, reação sem DNA.

C. pararugosa mostrou um padrão realmente muito diferente das outras espécies (e a diferença não esteve restrita apenas em relação ao tamanho). *C. rugosa* e o isolado L96D tiveram um perfil mais semelhante em todas as regiões comparadas (Tabela 10).

A análise filogenética com base na sequência da região D1/D2, corrobora essa observação. *C. pararugosa* e SK75 estão na base da árvore, onde as porcentagens do agrupamento das replicatas demonstram uma análise mais confiável. *C. rugosa* e L96D estão inseridas em uma região menos estável, evidenciada pelas baixas porcentagens de agrupamento (Fig. 19).

Tabela 10. Comparação entre as regiões do cistron ribossomal das quatro espécies estudadas

Espécie	Gene Tamanho	<i>C. rugosa</i>		L96D		SK 75	
		Indels	Trocas	indels	Trocas	indels	Trocas
L96D	18S	5	10				
	1744 bp	0,3%	0,6%				
	ITS1/5.8S/ITS2	7	44				
	336 bp	2,1%	13,1%				
	28S	0	6				
	542 bp	0,0%	1,1%				
SK75	18S	38	125	35	123		
	1747 bp	2,2%	7,2%	2,0%	7,0%		
	ITS1/5.8S/ITS2	10	83	7	82		
	339 bp	2,9%	24,5%	2,1%	24,2%		
	28S	3	38	3	40		
	543 bp	0,6%	7,0%	0,6%	7,4%		
<i>C. pararugosa</i>	18S	99	455	148	490	99	460
	1750 bp	5,7%	25,4%	8,5%	28,0%	5,7%	26,3%
	ITS1/5.8S/ITS2	58	212	63	21	54	217
	353 bp	16,4%	60,1%	17,8%	9,1%	15,3%	61,5%
	28S	76	268	81	279	68	258
	601 bp	12,6%	44,6%	13,5%	46,4%	11,3%	42,9%

Indels. Termo que designa inserção, deleção ou a combinação de ambos. Os valores correspondem às frequências absolutas das trocas de base ou indels, bem como as respectivas frequências relativas multiplicadas por 100. Os dados foram obtidos pelo alinhamento global com o algoritmo Needleman-Wunsch, disponível no sítio do BLAST.

4.4.5. Uso da PCR em Tempo Real para identificação das espécies

A RFLP se mostrou eficiente na identificação das espécies desse grupo. O uso da PCR em tempo real nesse caso também objetiva a genotipagem, mas com aplicação restrita. O alvo na região ITS1 foi mantido pelos mesmos motivos apresentados para o grupo de *P. guilliermondii* e o iniciador ancorado

no 18S foi mantido uma vez que a sequência é conservada entre todas as espécies testadas (Fig. 20).

Figura 19. Análise filogenética pelo método Neighbor-Joining. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Jukes-Cantor. Foram criadas 1000 replicatas utilizando o teste filogenético “bootstrap”. Os números próximos aos braços representam a porcentagem com que as replicatas se agruparam. A árvore foi construída em escala, com comprimentos de ramo representando o número de substituições por posição. Havia um total de 440 posições no conjunto de dados final; todas as posições que continham lacunas e falta de dados foram eliminadas. Todas as ferramentas utilizadas nesta etapa foram do MEGA5. O isolado L96D faz parte do agrupamento 2 e *C. rugosa*, grupo 3 (indicadas em sobrescrito nos grupos). *C. pararugosa* e SK 75, não se agruparam e estão na base da árvore.

Para esse grupo optamos pelo ensaio *singleplex*, devido à limitação do aparelho que possui apenas os filtros para os fluoróforos 6FAM, NED e VIC, assim, duas sondas foram marcadas com o mesmo repórter (Tabela 1).

```

C. mesorugosa TGAACCTGCGGAAGGATCATTAGAATA-CTGTTTAACACTGIGTC-TGAGCACGATACAC-----GCAAACCGAT
C. rugosa      TGAACCTGCGGAAGGATCATTACAACAATACTTTGTGTC-TGAACAATAACTTC-----AAGTACCGAT
C. metarugosa  TGAACCTGCGGAAGGATCATTACAATAAC-CTTAGCATTGTGTC-CACACAAATTAACC-----CTAACCATAT
C. pararugosa  TGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGATTATTGATACTTTGTGAAACAAATGATAAGCTTTTATGCGAAATACTTTT
*****
C. mesorugosa CATCAACACGCT-----AAA-CAAACTTTCAACACGGATCTCTAGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
C. rugosa      CATCAAATGTT-----AAAAAACTTTCAACACGGATCTCTAGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
C. metarugosa  AATCAATTGTT-----TAGTCAAACTTTCAACACGGATCTCTAGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
C. pararugosa  TATTAAATTTAGTCTAATACGAAAAAATCAAAACCTTTAACATGGATCTCTTGGTTCCTGATCGATGAAGAACG
** ** * ***** ** ***** ***** ***** *****

```

Figura 20 Alinhamento múltiplo das seqüências para a região polimórfica

ITS1. Uma seqüência representativa de cada espécie foi usada no alinhamento múltiplo com o programa ClustalX. As caixas em cinza correspondem ao alvo dos iniciadores e as letras sublinhadas, ao alvo das sondas.

Dois testes, sonda/alvo específico e sonda/alvos inespecíficos, confirmaram fidelidade do ensaio (Fig. 21). A existência de amplicons em todas as reações é esperada uma vez que os iniciadores são genéricos. Confirmou-se a existência de amplicons com um gel de agarose 2% corado com brometo de etídio carregado com o produto da amplificação, entretanto, houve emissão do repórter apenas na configuração correta.

4.5. Indução *in vitro* da transição dimórfica em *C. albicans*

O objetivo de induzir *in vitro* a transição dimórfica em *C. albicans* era criar um sistema eficiente e em pequeno volume que permitisse testar as frações obtidas com o fracionamento do SFB. Era uma limitação metodológica a ser vencida, uma vez que o número de frações poderia ser muito grande e ainda, o pequeno volume de cada fração poderia ter uma correlação direta com a concentração da espécie química na amostra, assim, inicialmente o ideal seria a mínima diluição e ver o comportamento do fungo em resposta.

Figura 21. Amplificação do ensaio de PCR em Tempo Real monitorada por sondas TaqMan® MGB. O gráfico ΔRn em função do ciclo mostra a detecção do amplicon específico para *Candida* sp. SK75 (verde); *C. pararugosa*, (azul); *Candida* sp.L96D (rosa); e *C. rugosa* (vermelho)

Entretanto, os testes para a indução da transição dimórfica ganharam outra dimensão quando começamos a investigar o fenômeno da adesão ao substrato, etapa inicial e necessária para que a transição dimórfica ocorra. O modelo empregando membrana biológica foi o primeiro a ser testado e a idéia evoluiu para o uso de membranas sintéticas.

4.5.1. Ensaio empregando membrana biológica

Esse modelo permitiu avaliar várias características descritas como essenciais à virulência: capacidade do fungo de adesão ao substrato, mesmo sob agitação constante; cultivo a 37°C e transição dimórfica na presença ou ausência de um indutor químico. Em presença de SFB, houve uma intensa colonização do ovo (Fig. 22A, setas) com lesões que muito se assemelham às infecções da mucosa oral (sapinhos) ou vulvovaginites, entretanto, essa colonização não foi observada quando o cultivo foi realizado apenas com o meio mínimo sem a presença de SFB (Fig. 22 B).

A microscopia de contraste de fase da membrana do ovo colonizado revelou uma grande quantidade de hifas provavelmente aderidas à superfície contendo clamidoconídeos laterais (Fig. 22C). A resolução não é suficiente para estudar a interação entre as membranas do ovo e da parede da hifa, mas foi possível observar estruturas como clamidoconídeos, formas de resistência capazes de iniciar um novo ciclo vegetativo do fungo (Fig. 22D).

4.5.2. Ensaio empregando membrana sintética de nitrocelulose

Os resultados obtidos com a membrana biológica nos fez pensar em outro modelo, o uso de membrana sintética. Buscamos reproduzir em membranas de nitrocelulose de porosidades diferentes o mesmo fenômeno observado empregando a membrana do ovo.

Os testes com as membranas de poros, 3, 5 e 8 micrômetros foram positivos no ensaio de filamentação e invasão do ágar, mesmo quando não havia SFB no meio de cultura (Fig. 23 B e C; 24 A e B). Entretanto, quando o fungo cresceu diretamente na superfície do ágar, sem a presença de membrana ou indutor químico, este cresceu na forma de levedura.

Figura 22. Ensaio de filamentação e invasão empregando membrana biológica. Ensaio realizado com ovo de codorna para verificar a capacidade de adesão, filamentação e invasão do fungo em tecido biológico. Em **A**, ovo com extensa colonização em toda sua superfície (setas); Em **B**, membrana íntegra e ausência de colonização; Em **C**, hifas com clamidoconídeos laterais na superfície da membrana do ovo; e em **D**, projeção de uma hifa a partir da membrana do ovo apresentando clamidósporos laterais e apicais. **A** e **B**, imagens obtidas com câmera digital Canon, ajustada com a função macro, **C** e **D** imagem obtida por microscopia óptica, Microscópio Leica DMLB, aumento de 100X em **C** e 400X em **D**.

Figura 23. Ensaio de filamentação com membrana sintética. Nesse ensaio, uma face da membrana ficou em contato com o meio sólido e na outra face fizemos o inóculo a partir de uma suspensão diluída do fungo. Em **A**, Colônia de cor esverdeada crescendo na superfície da membrana. Em **B**, a membrana foi removida e o círculo que se vê é a presença de hifas que emergiram da membrana (lado oposto à face A) e penetraram no interior do ágar. Em **C**, microscopia óptica de um corte transversal do meio de cultura onde se pode observar a presença de hifas e clamidoconídeos (setas). A linha mais espessa ao centro (ou no topo) da imagem corresponde à superfície do ágar onde a membrana esteve depositada e abaixo vemos o ágar invadido por hifas e clamidoconídeos. As imagens em **A** e **B** foram obtidas com câmera digital Canon e em **C**, com microscópio óptico Leica DMLB, aumento 250X.

Figura 24. Ensaio de filamentação com membrana sintética. Nesse ensaio, uma face da membrana ficou em contato com o meio sólido e na outra face fizemos o inóculo a partir de uma suspensão diluída do fungo. Em **A**, projeções das hifas dentro do ágar em fase tardia de brotamento. Em **B**, projeções das hifas dentro do ágar em fase inicial de brotamento. Em **C e D**, microscopia óptica de um corte da membrana (da face em contato com o ágar) com presença de hifas e clamidoconídeos. As imagens foram obtidas com microscópio óptico Leica DMLB, aumento 250X em **A e B** e 400X em **C e D**.

A coloração esverdeada da colônia é resultante do meio base usado (ChromAgar *Candida*) com o objetivo de certificar que o inóculo era puro, pois a existência de outra coloração indicaria a contaminação com outra espécie (Figura 23, A e B).

As análises das membranas e do ágar contendo hifas indicam um mesmo modelo de invasão, onde inicialmente apenas as hifas atravessam a membrana e invadem o ágar, em seguida ocorreram brotamentos laterais e apicais favorecendo a dispersão do fungo no meio de cultura (Fig. 24).

4.5.3. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia em contraste de fase apesar de ter revelado muito das mudanças morfológicas do fungo no ensaio de membranas, é insuficiente para se ter uma idéia da interação entre as hifas e a própria membrana. Para romper essa limitação, buscamos alternativa na microscopia eletrônica de varredura. Com essa abordagem tivemos acesso à topologia de ambas as faces da membrana, onde ocorreu o inóculo e do outro lado onde ocorre o brotamento das formas filamentosas (Fig. 25).

Os dados obtidos com o sistema de membranas, biológica ou sintética, podem ser interpretados de maneira semelhante a dois modelos apresentados recentemente por grupos independentes (Zhu e Filler, 2010; Dalle et al., 2010). Em ambos, o processo seria o mesmo: adesão ao substrato, transição de levedura para hifa e invasão do substrato pela forma filamentosa (Fig. 26).

4.5.4. Avaliação da expressão gênica de alguns genes envolvidos na transição dimórfica

As modificações metodológicas objetivando a obtenção de formas filamentosas foram positivas, mas buscamos avaliar se a mudança estrutural do fungo estava sendo acompanhada pela mudança no padrão de transcrição de alguns genes que são apontados na literatura como importantes para o processo de transição dimórfica, e ainda, alguns cuja transcrição ocorre exclusivamente na fase micelial.

Essa avaliação ocorreu em dois momentos, quantificação relativa da expressão dos genes de interesse por PCR em Tempo Real e mais adiante, um imunoensaio para detecção de 2 proteínas exclusivas da parede da hifa.

Figura 25. Microscopia Eletrônica de Varredura das Membranas Sintéticas. A microscopia foi realizada com MEV de média resolução, com um aumento de 800x em A e 750x em B. O painel **A** corresponde à face da membrana onde o inóculo foi feito, a seta preta indica uma forma leveduriforme aderida à membrana, em amarelo é indicado um tubo germinativo, as setas vermelhas indicam um bortamento a partir da hifa principal que se projeta e penetra a membrana. Em **B**, face da membrana que ficou em contato com o meio de cultura. As setas pretas indicam as projeções das hifas, a partir da membrana.

Figura 26. Modelos de filamentação e invasão do epitélio. O esquema na parte superior do painel foi obtido de Zhu e Filler (2010) e as imagens de MEV na parte inferior, são de Dalle et. al. (2010). Os modelos evidenciam as características de adesão, filamentação e invasão do epitélio. Na parte inferior do painel, em **A** e **B**, forte estrutura de aderência existente entre a parede da hifa e o epitélio (setas). Em **C** e **D**, a hifa penetra o epitélio ativamente através das junções celulares ou diretamente através da célula. **F** é uma ampliação da imagem em **E**, mostrando o ponto exato de onde a hifa penetra e a interação íntima entre as estruturas da parede do fungo com o epitélio.

4.5.4.1. PCR em Tempo Real: avaliação da eficiência dos iniciadores

Os testes realizados para avaliar a eficiência dos iniciadores e a existência de possíveis inibidores nas amostras de cDNA que viessem a comprometer a eficiência da reação tiveram bons resultados. A curva de dissociação dos iniciadores mostrou a inexistência de amplificação inespecífica e/ou dímeros de iniciadores. Os produtos dessas reações também foram analisados em gel de agarose 2%, e continham apenas o amplicon com o tamanho esperado para cada iniciador.

A eficiência da reação não atingiu 100%, entretanto, esteve dentro do limite aceito como normal e o dado da eficiência é usado na etapa da análise pelo programa qbasePlus. Para uma reação 100% eficiente, o cálculo da expressão relativo é dado por $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Para reações com eficiência inferior a 100% a correção é feita usando a fórmula $(1+E)^{-\Delta\Delta C_T}$, onde E é a eficiência da reação.

4.5.4.2. Método do C_T comparativo com o sistema SYBR® Green

A transcrição de 11 genes em 20 condições diferentes foi monitorada pela quantificação relativa usando o sistema SYBR Green®. Oito genes são da família ALS e os outros 3, relacionados ou com o estado micelial, ou com a transição dimórfica. Oito controles endógenos foram testados e para a estratégia de normalização optamos pela média global dos três mais estáveis segundo os parâmetros de análise do geNorm que integra o grupo de ferramentas do qBasePlus, são eles RPP2B (proteína ácida ribossomal P2B), RIP (ubiquinol citocromo-c redutase) e LSC2 (succinil-CoA sintetase).

As 20 condições de cultivo testadas foram: (1) WO, (2) WO 15% SFB v/v, (3) YPD, (4) YPD 15% SFB, (5) SFB puro, (6) face do inóculo WO

membrana, (7) membrana em WO; (8) face de contato com o meio WO, 9, 10 e 11, idem aos itens 5, 6 e 7 acrescidos de 15% SFB; as condições de 12 a 17 são as mesmas descritas de 6 a 11, alterando-se o WO por YPD e as três últimas, correspondem à troca do meio base por SFB (similar a 6, 7 e 8).

Quatro condições de cultivo (aparentemente) impuseram uma restrição severa ao crescimento do fungo. Não foi possível recuperar as formas leveduriformes ou filamentosas de membranas que permaneceram em contato com WO ou WO suplementado com 15% SFB (condições 7, 8, 10 e 11), assim, uma vez que o fungo não conseguiu atravessar a barreira física, também não foi possível recuperá-lo do lado oposto ao inóculo (F2) e consequentemente essas variáveis tiveram que ser retiradas do estudo. Nas outras combinações a introdução da membrana resultou em um padrão semelhante de crescimento (Fig. 23), com exceção feita à face do inóculo (FI) do sistema usando SFB. Nessa região, a recuperação de células foi mínima, mas como havia formas filamentosas abundantes na membrana e no caldo, provavelmente a maior parte das células usadas no inóculo tenha se diferenciado para a forma filamentosa, condição esta observada quando o inóculo é feito em SFB puro.

O cultivo em YPD ou WO caldo favoreceu o crescimento de células planctônicas e em SFB puro, houve a formação de grumos composto basicamente por formas filamentosas. A associação entre SFB e WO induziu a formação de hifas no cultivo com clara diferença qualitativa para a associação entre YPD e SFB.

Seis dos onze genes testados (ALS2, ALS4, ALS5, ALS6, ALS7 e ALS9) tiveram um perfil semelhante em todas as condições, entretanto, os outros

cinco (ALS1, ALS3, CZF1, ECE1 e HWP1) requerem mais atenção na análise dos resultados.

Para o fator de transcrição CZF1, quatro condições (WO, WO face do inóculo - FI, YPD face de contato com o meio – F2, YPD SFB FI,) induziram mais sua expressão em relação às demais, com grande diferença para a face do inóculo quando o cultivo foi apenas com em WO (Fig. 27).

Figura 27. Gráfico da quantificação relativa da expressão do fator de transcrição CZF1. As amostras foram dispostas por ordem da condição de crescimento. FI significa a face da membrana onde foi feito o inóculo e F2 a face de contato com o meio. A barra de erro está relacionada ao desvio padrão dos C_T das duplicatas de cada condição.

A condição WO FI também exerceu um efeito indutor sobre a expressão da proteína de adesão ALS1, aproximadamente 24 vezes para o mesmo meio na ausência da membrana (Fig. 28). As outras condições que podem ser destacadas são YPD FI, a fração da membrana quando em cultivo em YPD suplementado com 15% SFB v/v, e a face de contato com o SFB puro.

ALS3 apresentou um perfil de expressão distinto, as condições membrana do cultivo em YPD e YPD SFB F2 se destacam das demais, mesmo considerando a grande desvio padrão da última condição. Os cultivos em SFB e WO SFB FI tiveram um perfil semelhante e intermediário entre os dois primeiros e as demais condições de cultivo (Fig. 29).

Figura 28. Gráfico da quantificação relativa da expressão do fator de transcrição ALS1. As amostras foram dispostas por ordem da condição de crescimento. **FI**, significa a face da membrana onde foi feito o inóculo e **F2** a face de contato com o meio. A barra de erro está relacionada ao desvio padrão dos C_T das duplicatas de cada condição.

Figura 29. Gráfico da quantificação relativa da expressão da proteína de adesão ALS3. As amostras foram dispostas por ordem da condição de crescimento. **FI**, significa a face da membrana onde foi feito o inóculo e **F2** a face de contato com o meio. A barra de erro está relacionada ao desvio padrão dos C_T das duplicatas de cada condição.

A expressão dos dois últimos genes de interesse, HWP1 e ECE1 foi semelhante, com predominância para os sistemas contendo SFB, membrana, ou ainda a combinação desses dois (Fig. 30 e 31).

4.5.5. Imunoensaio para detecção das proteínas ECE1 e HWP1

Com base em dados da literatura, monitoramos duas proteínas cuja expressão é exclusiva da fase micelial de *C. albicans*: Ece1 (elongation cell factor 1) e Hwp1 (hiphal wall protein 1). Foram criadas duas construções para expressar a região N-terminal de ambas as proteínas, os fragmentos recombinantes purificados foram inoculados em coelho para obter os anticorpos de interesse.

Figura 30. Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene ECE1. As amostras foram dispostas por ordem da condição de crescimento. **FI**, significa a face da membrana onde foi feito o inóculo e **F2** a face de contato com o meio. A barra de erro está relacionada ao desvio padrão dos C_T das duplicatas de cada condição.

Figura 31. Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene HWP1. As amostras foram dispostas por ordem da condição de crescimento. **FI**, significa a face da membrana onde foi feito o inóculo e **F2** a face de contato com o meio. A barra de erro está relacionada ao desvio padrão dos C_T das duplicatas de cada condição.

4.5.5.1 Análise *in silico* e desenho dos iniciadores.

A primeira etapa na avaliação *in silico* das proteínas de interesse foi verificar a existência de peptídeo sinal e/ou domínios transmembrana. O programa SignalP 3.0, usado para verificar a existência do peptídeo sinal, faz uma predição da presença e local de sítios de clivagem do peptídeo sinal em sequência de aminoácidos. O programa analisa a sequência usando dois algoritmos: “Neural Networks” (NN) e Hidden Markov Models (HMM), ambos treinados em eucariotos.

Para Ece1p, ambos os modelos fizeram a predição para o ponto de clivagem entre os resíduos 18 e 19 da sequência de aminoácidos. Abaixo (Fig. 32, 33 e 34) são mostrados a sequência submetida e os resultados obtidos.

MKFSKIACATVFALSSQAIIHHAPEFNMKRDVAPAAPAPADQAPTVPAPQEFNTAIT
 KRSIIIGIIMGILGNIPQVIQIIMSIVKAFKGNKREDIDSVAGIIADMPFVVRAVDTAM
 TSVASTKRDGANDDVANAVVRLPEIVARVATGVQQSIENAKRDGVPDVGLNLVANAPRL
 ISNVFDGVSETVQQAQRDGLDGLDELLQRLPQLITRSAESALKDSQPVKRDAGSVALS
 NLIKKSIETVGIENAAQIVSERDISSLIEEYFGKA

Figura 32 Proteína Ece1. Sequência da proteína Ece1 com 271 resíduos de aminoácidos. A caixa amarela delimita a região provável do peptídeo sinal; a caixa azul a região citoplasmática; em vermelho o domínio transmembrana e sem marcação a região extracelular da proteína.

Para a proteína Hwp1, esses modelos fizeram a predição para o ponto de clivagem entre os resíduos 27 e 28 da sequência de aminoácidos. Abaixo (Fig. 35, 36 e 37) são mostrados a sequência submetida e os resultados obtidos.

Figura 33. Predição do peptídeo sinal para a proteína Ece1 como o algoritmo SiganIP-NN. Em **A**, representação gráfica da predição gerada pelo algoritmo. C (vermelho) corresponde à predição do sítio de clivagem; S (verde) prediz qual parte da sequencia corresponde ao peptídeo sinal e qual parte pertence à proteína; e Y (azul) também indica o sítio de clivagem, porém o valor é derivado da combinação de C e Y. Em **B**, uma tabela que resume as posições dos resíduos que obtiveram os maiores valores nesse sistema de pontuação e a posição mais provável do sítio de clivagem.

Figura 34. Predição do peptídeo sinal para a proteína Ece1 com o algoritmo SiganIP-HMM. O modelo HMM prevê a probabilidade de existência ou não do peptídeo sinal, bem como a existência de sinal de âncora de GPI (Glicosil Fosfatidil Inositol). Em **A**, representação gráfica da predição de existência do sítio de clivagem e das regiões N, H e C do peptídeo sinal; e em **B**, uma tabela que resume as probabilidades encontradas e posição mais provável do sítio de clivagem.

MRLSTAQLIAIAYYMLSIGATVPQVDGQGETEELIQKRSYDYYQEPCDDYPQQQQQQQEP
PCDYPQQQQQQEPCDYPQQQPQEPCDYPQQQPQEPCDYPQQQPQEPCDNP
QPDVPCDNPPQPDVPCDNPPQPDIPCDNPPQPDIPCDNPPQPDQPDNDNPPIPNIPTDWI
PNIPTDWIPDIPEKPTTPATTPNIPATTTTSESSSSSSSSSSSTTPKTSASTTPESSVP
ATTPNTSVPTTSESTTPATSPESSVPVTSGSSILATTSESSSAPATTPNTSVPTTTTE
AKSSSTPLTTTTEHDTTVVTVTSCSNSVCTESEVTTGVIVITSKDTIYTTYCPLTETTP
VSTAPATETPTGTVSTSTEQSTTVITVTSCSESSCTESEVTTGVVVVTSEETVYTTFCP
LTENTPGTDSTPEASIPPMETIPAGSESSMPAGETSPAVPKSDVPATESAPVPEMTPAG
SQPSIPAGETSPAVPKSDVPATESAPAPEMTPAGTETKPAAPKSSAPATEPSPVAPGTE
SAPAGPGASSPKSSVLASETSPIAPGAETAPAGSSGAITIPESSAVVSTTEGAIPTTL
ESVPLMQPSANYSSVAPISTFEGAGNNMRLTFGAAIIGIAAFLI

Figura 35. Proteína Hwp1. Sequência da proteína Hwp1 com 634 resíduos de aminoácidos. A caixa amarela delimita a região provável do peptídeo sinal; e a caixa sem marcação, a região extracelular da proteína.

Figura 36. Predição do peptídeo sinal para a proteína Hwp1 com o algoritmo SignalP-HMM. Em **A**, representação gráfica da predição gerada pelo algoritmo. C (vermelho) corresponde à predição do sítio de clivagem; S (verde) prediz qual parte da sequência corresponde ao peptídeo sinal e qual parte pertence à proteína; e Y (azul) também indica o sítio de clivagem, porém o valor é derivado da combinação de C e Y. Em **B**, uma tabela que resume as posições dos resíduos que obtiveram os maiores valores nesse sistema de pontuação e a posição mais provável do sítio de clivagem.

Figura 37. Predição do peptídeo sinal para a proteína Hwp1 como o algoritmo SiganIP-HMM. O modelo HMM prevê a probabilidade de existência ou não do peptídeo sinal, bem como a existência de sinal de âncora de GPI. Em **A**, representação gráfica da predição de existência do sítio de clivagem e das regiões N, H e C do peptídeo sinal; e em **B** uma tabela que resume as probabilidades encontradas e posição mais provável do sítio de clivagem.

A segunda etapa do processamento *in silico* de ambas as proteínas consistiu em desenhar iniciadores para a região extracelular dessas proteínas. O desenho dos iniciadores foi feito com auxílio da ferramenta Primer Express v.2.0 com os parâmetros padrões (Applied BiosystemsTM) (Tabela 1). O cuidado nessa etapa foi calcular exatamente o tamanho e fase de leitura do amplicon para que depois de clonado no vetor, fosse expresso exatamente o segmento desejado da proteína.

O programa TMHMM, usado para prever a presença de hélices transmembrana, indicou um domínio para Ece1p (Fig. 38, A e B), e para a proteína Hwp1p não foram encontradas hélices transmembrana (Fig. 38, C e D).

Figura 38. Predição de hélices transmembrana com o algoritmo TMHMM.

O modelo TMHMM prediz a existência de hélices transmembrana. **A** e **B**, representação para a proteína Ece1, **C** e **D**, proteínas Hwp1. Em **A** e **C**, tabela resumida constando entre outros dados, o número de hélices previstas, bem como a orientação do posicionamento dos resíduos da sequência primária, dividindo-os em três regiões, citoplasmática ou intracelular, transmembrana e extracelular. Em **B** e **D** estão representados graficamente os dados da tabela.

Optamos em inserir o sítio de restrição GGATCC clivável pela enzima *Bam*H1 em todos os iniciadores para facilitar os procedimentos de clonagem, utilizando nesse caso, apenas uma endonuclease de restrição para o preparo do vetor e inserto.

4.5.5.2. Clonagem em vetor de seqüenciamento e de expressão.

Os amplicons foram clonados inicialmente no vetor PCR[®]2.1-TOPO[®]. Após a clonagem, preparação do DNA plasmidial e seqüenciamento, dois clones de cada proteína contendo a sequência correta foram digeridos com

*Bam*H1, os fragmentos de restrição foram preparados e clonados no vetor de expressão pET15B. Esse passo intermediário é importante por dois motivos: temos a informação genética de interesse em um vetor multicópia e podemos obter em abundância o segmento desejado, liberando o inserto a partir do vetor com a enzima de escolha e purificando esta banda do gel, para a etapa seguinte de ligação ao vetor de expressão.

Antes de proceder à expressão, seqüenciamos as construções em vetor de expressão para confirmar não apenas a sequência, mas se a fase de leitura da proteína de interesse seria respeitada em relação à sequência do vetor (Fig. 39 e 40). Para a tradução da sequência de DNA utilizamos a ferramenta “Translate DNA” do programa EditSeq™ v. 5.0 do DNASTar.

GENE ID: 3646784 ECE1 | Candida orf whose expression is associated with Cell Elongation [Candida albicans SC5314]. Score = 346 bits (888), Expect = 7e-94, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 177/178 (99%), Positives = 177/178 (99%), Gaps = 0/178(0%).

```
Query  MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPQVIQIIMSIVKAFKGNKREDIDSVVAGIADMPFVVRAVDTAMTSVASTKR
      PQVIQIIMSIVKAFKGNKREDIDSVVAGIADMPFVVRAVDTAMTSVASTKR
Sbjct  PQVIQIIMSIVKAFKGNKREDIDSVVAGIADMPFVVRAVDTAMTSVASTKR

Query  DGANDDVANAVVRLPEIVARVATGVQQSIENAKRDGVPDVGLNLVANAPRLISNVFDGVETVQQAQRDGLDFLD
      DGANDDVANAVVRLPEIVARVATGVQQSIENAKRDGVPDVGLNLVANAPRLISNVFDGVETVQQAQRDGLDFLD
Sbjct  DGANDDVANAVVRLPEIVARVATGVQQSIENAKRDGVPDVGLNLVANAPRLISNVFDGVETVQQAQRDGLDFLD

Query  ELLQRLPQLITRSAESALKDSQPVKRDAGSVALSNLIKKSIE TVGIENAAODPAANKARKEAELAAATAEQ.
      ELLQRLPQLITRSAESALKDSQPVKRDAGSVALSNLIKKSIE TVGIENAA
Sbjct  ELLQRLPQLITRSAESALKDSQPVKRDAGSVALSNLIKKSIE TVGIENAA
```

Figura 39. Comparação do fragmento expresso da proteína Ece1 com o banco não redundante de sequências protéicas. A comparação entre o fragmento expresso da proteína Ece1 (Query) com banco nr (Sbjct) foi feito com o algoritmo blastp. Em azul estão evidenciadas as sequências correspondentes ao vetor e o ponto ao final da sequência corresponde ao códon de parada. A sequência intercalada entre o Query e o Sbjct corresponde às identidades e em vermelho está evidenciada uma variação entre as sequências.

gb|AAC96368.1|hyphal wall protein 1 [Candida albicans]
 Length = 634. Score = 264 bits (674), Expect = 3e-69,
 Method: Compositional matrix adjust. Identities = 153/153
 (100%), Positives = 153/153 (100%), Gaps = 0/153 (0%)

```
Query  MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPQVDGQGETEEALIQKRSYDYYQEP CDDYPQQQQQQEPCDYPQQQQQEEP
      PQVDGQGETEEALIQKRSYDYYQEP CDDYPQQQQQQEPCDYPQQQQQEEP
Sbjct  PQVDGQGETEEALIQKRSYDYYQEP CDDYPQQQQQQEPCDYPQQQQQEEP
      PQVDGQGETEEALIQKRSYDYYQEP CDDYPQQQQQQEPCDYPQQQQQEEP

Query  CDYPQQQPQEP CDPYQQPQEP CDPYQQPQEP CDPYQQPQEP CDPNPPQPDVPCDNPPQPDVPCDNPPQPDIPCDN
      CDYPQQQPQEP CDPYQQPQEP CDPYQQPQEP CDPYQQPQEP CDPNPPQPDVPCDNPPQPDVPCDNPPQPDIPCDN
Sbjct  CDYPQQQPQEP CDPYQQPQEP CDPYQQPQEP CDPYQQPQEP CDPNPPQPDVPCDNPPQPDVPCDNPPQPDIPCDN
      CDYPQQQPQEP CDPYQQPQEP CDPYQQPQEP CDPYQQPQEP CDPNPPQPDVPCDNPPQPDVPCDNPPQPDIPCDN

Query  PPQPDIPCDNPPQPDQPDNPPPIPIPIPTDPAANKARKEAELAAATAEQ.
      PPQPDIPCDNPPQPDQPDNPPPIPIPIPTD
Sbjct  PPQPDIPCDNPPQPDQPDNPPPIPIPIPTD
```

Figura 40. Comparação do fragmento expresso da proteína Hwp1 com o banco não redundante de sequências protéicas. A comparação entre o fragmento expresso da proteína Hwp1 (Query) com banco nr (Sbjct) foi feito com o algoritmo blastp. Em azul estão evidenciadas as sequências correspondentes ao vetor e o ponto ao final da sequência corresponde ao códon de parada. A sequência intercalada entre o Query e o Sbjct corresponde às identidades.

A análise da comparação feita contra o banco de sequências protéicas para Ece1 mostrou um polimorfismo que inicialmente não sabíamos se era um artefato do processamento *in vitro* ou correspondia exatamente a uma variação biológica normal. Pare dirimir a dúvida fizemos uma busca no banco *nr* de sequências nucléicas para todas as sequências depositadas para ECE1 bem como processamos e seqüenciamos o material genético de outras linhagens de *C. albicans* existentes no laboratório e observamos que esse gene é altamente polimórfico em seu domínio extracelular. Representamos esse polimorfismo (Fig. 41) através de uma sequência consenso contendo as bases degeneradas correspondentes às alterações encontradas.

ATGAAATTCTCCAAAATTGCCTGTGCTACTGTTTTGCTTTATCTTCTCAAGCTGC
 CATCATCCACCATGCTCCAGAATTCAACATGAAGAGAGATGTTGCTCCAGCTGCCC
 CAGCTGCTCCAGCTGACCAAGCACCTACTGTTCTGCACCTCAAGAATTCAATACT
 GCTATTACCAAAGAAGTATTATTGGAATTATTATGGGTATTCTTGGCAACATTCC
 ACAAGTAATCCAAATCATCATGAGTATTGTCAAAGCTTTCAAAGGTAACAAGAGAG
 AAGATATTGATTCTGTTGTTGCTGGTATCATTGCTGATATGCCATTTGTTGTCAGA
 GCTGTTGACACAGCCATGACTTCTGTTGCTTCTACCAAGAGAGATGGAGCTAATGA
 TGACGTTGCTAATGCCGTCGTCAGATTGCCAGAAATTGTTGCTCGTGTGGCCACTG
 GTGTTCAACAATC^{YR}TCGAAAATGCCAAGAGAGATGGCGTTCCAGA^{YR}TTGG^YCTT
 AATCTTGTTGCTAATGCTCCAAGACTT^{WT}CTCT^RACGTTTTTGATGGCGTCTCTGGA
 AACTGTTCAACAAGCTAAGAGAGATGGTCTTGAAGAT^KTTCTT^{SA}WSAACT^YCTT^S
 A^WMR^RACTCCCACAACCTCATT^RCTAGATCAGCTGAATCTGCTTTGAAAGACAGTCAA
 CCAGTTAAAAGAGATGC^YGGCTCAGTAGCACTTAGCAATTTAATCAAAAAGAGCAT
 TGAAACTGTCGGTATTGAAAATGCTGCTCAAATTGTTTCAGAAAGAGATATTTCTT
 CTTTGATTGAAGAATATTTTCGGAAAAGCTTAA

Figura 41. Ece1 e seu polimorfismo no domínio extracelular. Sequência consenso para Ece1 a partir de sequências depositadas no banco nr de sequências nucleicas. A sequência destacada em amarelo corresponde ao peptídeo sinal; em azul, ao domínio intracelular; em verde, a hélice transmembrana; e sem marcação o domínio extracelular. Destacado em vermelho estão representados os polimorfismos encontrados: W(A ou T); R(A ou G); Y(T ou C); K(T ou G); M(C ou A).

Não encontramos descrição ou discussão na literatura sobre tal ocorrência, mas a frequência com que ocorre nos permite supor que exista alguma função biológica relacionada, por exemplo, evasão das defesas do hospedeiro ou diversidade para local de adesão. Entretanto, ainda não foi possível estudar melhor esse achado. Pretendemos futuramente voltar a essa questão, verificando, por exemplo, as alterações de bases frente à conservação ou troca do resíduo de aminoácido, bem como troca do resíduo, e possível repercussão nas características físicoquímicas da proteína e/ou sua imunogenicidade e afinidade pelo hospedeiro.

As linhagens de expressão *E. coli* BL₂₁ (DE₃) foram transformadas com os vetores de expressão pET15b-Ece1 e pET15b-Hwp1 e dois transformantes de cada proteína foram testados para a expressão das proteínas de interesse em um ensaio piloto. Tendo confirmado que estes transformantes estavam superexpressando as proteínas Ece1 e Hwp1, fizemos então um ensaio em escala maior para a purificação.

As proteínas produzidas através do vetor pET15b possuem uma cauda com seis resíduos de histidina em sequência (cauda de poli-histidina), esse motivo tem afinidade a alguns metais, entre eles o níquel o que facilita sua purificação por cromatografia líquida de afinidade a metais. As proteínas adsorvem à coluna inicialmente carregada com níquel. O aumento gradativo na concentração do eluente é fundamental na etapa de purificação das proteínas de interesse, pois promovem a liberação gradativa de proteínas da bactéria ricas em histidina. Para verificar o grau de pureza das frações eluídas, fizemos análise dessas frações em SDS-PAGE (Fig. 42)

Os antígenos purificados foram inoculados em coelho e todo o processo de obtenção dos anticorpos foi realizado pelo Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantã sob supervisão da Dra. Marilene Damasi.

4.5.5.3. Ensaio Elisa.

Inicialmente, realizamos um experimento apenas com a proteína purificada, uma alíquota do mesmo material usado para imunizar o coelho. Fizemos uma curva de diluição com seis pontos variando de 25 ng a 0,8 ng. O limite de detecção nesse ensaio foi 3,12 ng por poço, o que variou o coeficiente de determinação da função para menor que 1 ($R^2 = 0.98$), entretanto o resultado

foi suficientemente animador para iniciarmos os testes empregando o extrato total do fungo (Fig. 43).

Figura 42. Análise em SDS-PAGE da purificação de Ece1 e Hwp1. As frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE para verificar o grau de pureza. Em 6 e 14, BenchMark™ Protein Ladder Cat. 10747-012 (Invitrogen), as setas indicam o padrão de 25 KDa. em 1 e 2, extrato protéico total coletado depois de ter passado pela coluna carregada com níquel para Ece1 e Hwp1, respectivamente; 3, 4 e 5, lavagem da coluna com o tampão de ligação, tampão contendo 50, 100 e 150 mM de imidazol respectivamente; 7 ao 10, eluição com 500 mM imidazol para Ece1; 11 ao 13, eluição com 500 mM imidazol para Hwp1; 15 ao 19, frações finais eluídas para Ece1 e Hwp1.

Os testes com o extrato total de *C. albicans*, diferentemente do controle ainda não trouxeram resultados conclusivos sobre a expressão de Hwp1 na fase micelial do fungo. Esse ensaio ainda está em plena fase de desenvolvimento. Os resultados preliminares detectaram a expressão da proteína, não só no extrato do micélio, mas também naquele oriundo de blastóporos. Ainda para esse teste, fizemos uma contaminação proposital de

uma alíquota do precipitado final com uma concentração sabida da proteína pura (Fig. 44).

O teste de variância ANOVA indicou que a probabilidade dos conjuntos de dados agrupados como SFB e WO serem diferentes é 96%, nessa análise, o teste considera que o desvio padrão das replicatas não é significativo para o resultado.

Figura 43. Imunoensaio para detecção da proteína Hwp1 recombinante. O gráfico mostra a regressão linear entre a leitura da emissão do p-nitrofenolato a 405 nM em função da concentração da proteína por amostra. A equação da reta e o coeficiente de determinação são mostrados na área de plotagem do gráfico.

Interpolando os valores da leitura de do comprimento de onda de cada amostra com a curva de concentração, obtivemos a concentração da “proteína” Hwp1 para aquela amostra. Para o conjunto SFB, a média foi de $0,17 \text{ ng.mL}^{-1}$ ($\text{SD} \pm 3,4$) e para o conjunto WO, $0,11 \text{ ng.mL}^{-1}$ ($\text{SD} \pm 0,8$). Esse primeiro cálculo da média e do desvio padrão não contemplou os dados provenientes de

amostra contaminada. A contaminação foi feita na proporção 20:1 (95 μL da amostra do precipitado e 5 μL da proteína pura que corresponde a 12,5 μg). Nessa condição, o valor obtido para o conjunto SFB foi de 0,28 ng.mL^{-1} e para WO, 0,19 ng.mL^{-1} .

Figura 44. Imunoensaio para detecção da proteína Hwp1 no extrato total de *C. albicans*. No eixo Y, leitura da emissão do p-nitrofenolato a 405 nM em função da concentração da proteína na amostra. Em X, as diferentes amostras utilizadas, separadas nos grupos **SFB** que corresponde a condição que induz a forma micelial e **WO**, condição que mantem o fungo na fase leveduriforme. SBN1, 2 e 3, ordem dos sobrenadantes que foram sendo obtidos na obtenção do extrato. Gráfico gerado com o programa GraphPad Prism.

4.6. Fracionamento do soro fetal bovino

O fracionamento do SFB com a coluna MonoQTM resultou na identificação de frações que mantiveram a capacidade de induzir a transição dimórfica de *C. albicans*. Entretanto, a análise em SDS-PAGE dessas frações

mostrou uma grande concentração de duas proteínas, muito provavelmente, albumina e alfa-globulina, as proteínas mais abundantes do soro (Fig. 45).

Figura 45. Fracionamento do SFB por troca iônica em gradiente salino.

Análise em SDS-PAGE das frações eluídas do fracionamento do SFB em coluna MonoQ. Do 1 ao 3, frações 37, 38 e 39; 4, padrão de peso molecular para proteína; Do 5 ao 10, frações 40 a 45.

As frações 38 e 39 mantiveram a capacidade de induzir a filamentação em *C. albicans*, essas frações correspondem à maior absorbância em 280 nM (Fig. 46) e são as únicas frações com duas bandas visíveis no gel de poliacrilamida.

Para tentar melhorar a separação das moléculas presentes nas frações 38/39 da Mono QTM, misturamos e concentramos essas duas frações de 2 ml para 200 microlitros e tentamos uma segunda etapa de fracionamento numa coluna que faz a separação por tamanho e não por carga. Entretanto, nenhuma das frações obtidas no segundo fracionamento voltou a induzir a filamentação.

Quando testamos o SFB não fracionado observamos facilmente, em uma análise macroscópica da cultura, a existência de grumos que ao serem analisados em microscópio óptico revelam regiões distintas: uma região central densa com hifas em seu entorno se projetando para a periferia (Fig. 47A). Entretanto, o fracionamento do SFB com a coluna MonoQ, forneceu frações que foram capazes de induzir separadamente essas diferentes morfologias no

fungo. O fato de tais eventos aparecerem em frações diferentes nos fez pensar em indutores diferentes e vias distintas (Fig. 47B, C e D)

Figura 46. Fracionamento do SFB por troca iônica em gradiente salino. O gráfico mostra a absorbância em 280 nM em função de volume total eluído. Os números em vermelho separados pelas barras verticais são as frações; o gráfico em azul é a absorbância em 280 nM de cada fração e a linha diagonal verde, o gradiente salino.

A resolução alcançada com a microscopia de contraste de fase é insuficiente para determinar a estrutura da região mais densa presente no grumo com hifas (Fig. 47A) ou no grumo sem hifas (Fig. 47B), não sabemos se é algum tipo de matriz secretada pelas células ou até mesmo células modificadas fortemente aderidas entre si.

Figura 47. Fracionamento do SFB por troca iônica em gradiente salino. O teste de cultura com algumas frações revelaram características morfológicas distintas daquela encontrada no teste com SFB não fracionado. Em **A**, teste padrão utilizando SFB não fracionado. Em **B**, fração que induz a formação de grumos, mas sem a presença de hifas; e em **C** e **D**, frações que induzem a formação de grumos onde estão presentes apenas hifas. As imagens foram obtidas com microscópio óptico Leica DMLB, aumento 100X em **A** e **B** e 400X em **C** e 250 em **D**.

V. Discussão

O estudo da biologia dos fungos revela interações dinâmicas e complexas entre as formas vegetativas e o seu entorno com resposta imediata às alterações ambientais, evidenciando uma fantástica capacidade adaptativa essencial à sobrevivência e manutenção da espécie.

Candida albicans e espécies relacionadas apesar de apresentarem extrema habilidade de inter-relação com o meio ambiente, variando a forma vegetativa, o padrão de expressão gênica, acionando ou desligando vias metabólicas, vêm acumulando interesse da comunidade científica mais pelos aspectos clínicos do que pelo entendimento de sua biologia.

Normalmente, esses fungos são comensais e as infecções por eles causadas são ditas oportunistas que por definição é atribuída a qualquer fungo não-patogênico que possa produzir infecções tópicas ou disseminadas; são agentes de baixa virulência que causam doença em indivíduos imunocomprometidos (Koneman et al., 2008).

Entretanto, em casos clínicos tem havido aumento no isolamento de espécies desse gênero, ainda com predominância de *C. albicans*, bem como uma alta incidência de morte decorrente das infecções disseminadas, principalmente pela dificuldade de tratamento, uma vez que várias espécies apresentam resistência aos antifúngicos comumente utilizados (Moran et al., 1998; Pujol et al., 2004; Sandevén, et al 2006; Fradin e Hube, 2006).

Certamente justificativas como estas favorecem o financiamento de estudos voltados para o entendimento de como o fungo transita do estado

comensal para patogênico, processos mais eficientes de identificação, epidemiologia ou perfil de susceptibilidade a antifúngicos.

Vários estudos focam, por exemplo, na geração de mutantes para um determinado gene concebido como essencial para a virulência do fungo ou ainda na obtenção de indutores do estado micelial sem considerar que tais condições não são aplicáveis ao hospedeiro humano, como ressecamento do meio, privação de nitrogênio etc. Todavia, avanços na taxonomia dos fungos, critérios para se estabelecer espécies ou subespécies e caracterização do estado sexuado de várias espécies apresentam avanços discretos (Guarro et al., 1999).

Em essência, o escopo desse trabalho, fortemente influenciado pela literatura, esteve voltado para o estudo da relação fungo-hospedeiro visando um melhor entendimento da transição comensal-patogênico. Contudo, durante seu desenvolvimento percebemos a necessidade de uma base mais sólida do entendimento da biologia do fungo em si, iniciando pelo desenvolvimento de um sistema de identificação mais prático e eficiente e ainda compatível com o processamento de múltiplas amostras. Na etapa seguinte, focamos no desenvolvimento de um ensaio com componentes definidos e condições controladas que induzisse a transição dimórfica de forma consistente e reproduzível que pudesse favorecer o estudo de vias ativadas ou reprimidas e principalmente ao isolamento de variantes naturais ao fenótipo esperado para estudos e caracterização futura.

5.1. Identificação dos fungos.

A proposta inicial da metodologia de identificação era estabelecer uma ferramenta que pudesse diferenciar ou identificar fungos do gênero *Candida*,

etapa imprescindível para qualquer estudo posterior. Percebemos rapidamente as limitações dos métodos de identificação baseados nas características morfológicas ou bioquímicas das espécies, limitações estas já descritas anteriormente (Guarro et al., 1999); bem como a necessidade a uma alternativa ao seqüenciamento gênico com o mesmo grau de confiabilidade.

Para superar essas limitações voltamos nossa atenção para a técnica de RFLP, que já vinha sendo usada para diferenciar algumas espécies usando para tanto apenas as regiões ITS (Mirhendi et al., 2006). Uma fase preliminar do trabalho foi desenvolvida no mestrado (Mota, 2007), mas ainda havia a necessidade de validação e verificação da abrangência, bem como a padronização da técnica.

5.1.1. Extração do DNA total, método da microplaca.

A extração do DNA total é etapa essencial para inúmeros métodos em biologia molecular. Vários são os métodos existentes para essa prática e muitos já comercializados e sempre com inovações que tornam o método mais seguro, rápido e livre de contaminantes. Entretanto, para fungos, esses métodos em geral não permitem a extração de múltiplas amostras ao mesmo tempo e ainda são onerosos principalmente pensando em estudos epidemiológicos onde centenas de amostras são analisadas.

Como o número de amostras analisadas era muito grande, o método de extração desenvolvido aqui se mostrou muito útil, pois foi possível processar um grande número de amostras ao mesmo tempo o que aliou praticidade com economia. Esse método é perfeitamente compatível com a realidade de demanda de qualquer laboratório, pois é possível adaptá-lo para números que variem de 1 a 192 amostras a serem processadas simultaneamente. Além

disso, não faz uso de solventes orgânicos como fenol cuja contaminação compromete etapas futuras do processamento do DNA (ANEXO VI).

5.1.2. Método PCR-RFLP para identificação de fungos.

Diversas metodologias vêm, ao longo dos últimos anos, sendo descritas e aplicadas à identificação de fungos, em especial os leveduriformes, devido à grande dificuldade da diferenciação destes por serem extremamente semelhantes quanto à morfologia ou ao padrão metabólico.

A abordagem microbiológica clássica, apesar de largamente difundida tem limitações até o momento insuperáveis que são a impossibilidade de identificação de microorganismos não cultiváveis e a dificuldade de diferenciação de organismos proximamente relacionados.

A abordagem molecular tem se mostrado uma ferramenta poderosa, capaz de suprir satisfatoriamente tais limitações. Donnelly et al., (1999) propuseram um teste molecular baseado na amplificação de uma região intrônica do gene ACT1 específica de *Candida dubliniensis*, capaz de diferenciá-la de *Candida albicans*, algo que não é possível pela metodologia clássica. Entretanto essa amplificação diferencial tem duas limitações, necessita de uma identificação fenotípica prévia e só se aplica na diferenciação entre essas duas espécies.

Rodrigues e Carvalho (2006) patentearam um método que propunha usar PCR multiplex para identificar e/ou diferenciar oito espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*). O método consiste em um conjunto de iniciadores espécie-específicos endereçados para as regiões ITS 1 e ITS 2 do cistron ribossomal e dois iniciadores ancorados nos genes

18S e 28S também do cistron ribossomal. Existem vários problemas nessa abordagem, o primeiro é que os amplicons gerados são pequenos, em geral, menores que 400 pares de base (bp) estando a média em torno dos 200 bp. Na prática, amplicons com esse tamanho não dão uma boa resolução no gel e diferenças de poucas bases entre um amplicon e outro não são observáveis. Os autores também não mencionam o problema da diferenciação de espécies proximamente relacionadas como *C. guilliermondii* e *C. famata* ou *C. famata* e *C. palmioleophila* (Desnos-Ollivier, et al., 2008). A diferenciação entre essas espécies é difícilima, inclusive para abordagens moleculares que empregam o seqüenciamento do gene 18S.

Vários métodos propondo a utilização de sondas ou iniciadores espécie-específicos e detecção por hibridização ou amplificação de regiões distintas entre as espécies e seqüenciamento de regiões polimórficas também já foram publicados. Entretanto essas metodologias também não discutem a questão das espécies proximamente relacionadas e a necessidade de um grande número de sondas e iniciadores torna, em geral, os procedimentos pouco práticos e mais dispendiosos.

Jordan (2000), propôs a realização de uma PCR multiplex bem como um método quantitativo baseado em PCR. Basicamente, a inovação proposta por ele, em relação aos outros métodos, é a utilização de iniciadores e sondas, diferentes das anteriores. Para cada espécie usa-se um par de iniciadores e uma sonda diferente, assim, um teste para identificar poucas espécies gastaria muito material além de ser necessário todo o processo de hibridização das sondas marcadas com 3'digoxigenin-dUTP (DIG-dUTP) usando uma enzima

terminal transferase o que acaba comprometendo o método em relação à praticidade e custo.

O estudo do polimorfismo do DNA mitocondrial por RFLP foi realizado por Simón et al (1994), para essa técnica, ele extraiu o DNA total e usou uma endonuclease de restrição que reconhece muitos sítios no DNA genômico, mas poucos no DNA mitocondrial gerando assim, segundo ele, padrões específicos para cada espécie. A técnica de RFLP do DNA mitocondrial foi a primeira a ser usada na taxonomia, entretanto foi caindo em desuso porque nem sempre os padrões são claramente distintos, dependendo da concentração de DNA forma-se um borrão (“smear”) o no gel e digestões parciais dificultam a leitura do resultado.

Com o advento da PCR passou a haver uma associação entre PCR e RFLP e com ela várias vantagens como a possibilidade de manipulação do material genético mesmo a partir de quantidades mínimas da amostra original ou parcialmente degradadas; escolha de regiões específicas do genoma delimitadas pelos iniciadores o que favorece a reprodutibilidade do método; homogeneidade nos padrões de amplificação e posterior restrição e manipulação de um grande número de amostras ao mesmo tempo.

Mirhendi et al., (2006) explorou essa abordagem para *Candida* sp. sugerindo identificar 6 espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*. Os autores usaram a região ITS1/5.8S/ITS2 do rDNA. Entretanto, os autores comentam que o padrão entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* é idêntico. Além disso, apresentam um resultado com o mesmo método para três espécies não-*Candida*: *S. cerevisiae*, *T. asahii* e *C. neoformans* e há falhas visíveis na apresentação dos dados. Porém, é

possível ver semelhança entre os padrões de (1) *C. tropicalis* e *S. cerevisiae*, e (2) *C. neoformans* e *C. parapsilosis*. As limitações em abordagens como essa certamente está relacionada com o tamanho da região cujo amplicon não supera os 600 bp em média. Fungos com 1 ou dois sítios de clivagem terão fragmentos de restrição pequenos que resolvem mal em gel de agarose e ainda, como o alvo do procedimento é pequeno, a chance de diversidade entre espécies distintas se reduz.

Possibilidades como amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD), mapeamento de microssatélites e sequências repetitivas em tandem associadas ao telômero, bem como pirosequenciamento foram exploradas. Entretanto, baixa reprodutibilidade, semelhança de padrões entre espécies diferentes e padrões diferentes dentro de uma mesma espécie são alguns problemas relacionados a estas técnicas (Sadhu et al., 1991; Thanos et al. 1995; Guarro et al., 1999).

Para fungos, preferencialmente, são seqüenciadas as regiões ITS 1 e 2 ou a região D1/D2 do gene 28S. Essas regiões garantem uma ótima possibilidade de identificação para um vasto número de espécies. Entretanto para a rotina do laboratório essa abordagem é cara, pois o custo de clonagem e seqüenciamento é alto e requer em média 7 dias para ser executada em nossas condições.

Frente às dificuldades acima apontadas o método PCR-RFLP é bem mais prático, rápido e barato tanto em relação ao seqüenciamento quanto em relação ao API, pois é exeqüível em 12 horas se usar a quantidade de endonuclease recomendada pelo fabricante ou 24 horas se usar a quantidade reduzida; permite a manipulação de um grande número de amostras ao mesmo

tempo identificando pelo menos 33 espécies de forma inequívoca e essa base de dados tem ampla possibilidade de ser expandida.

O método aqui apresentado se mostrou robusto em todas as fases de seu desenvolvimento e validação e há demanda para tal ferramenta uma vez que os laboratórios de microbiologia clássica vêm adotando progressivamente métodos moleculares em suas rotinas diárias. A implantação desse método é simples, pois não requer uma estrutura complexa e cara; está organizado em 3 etapas seqüenciais: extração, amplificação e digestão e a interpretação é visual e simples, se faz através da comparação dos padrões obtidos nos ensaios com aqueles pré-estabelecidos. Essa ferramenta apresenta características úteis não apenas para quem trabalha com micoses oportunistas, mas sim em sentido mais amplo, pode ser aplicada para fungos em geral.

5.2. Uso da PCR em tempo real para genotipagem de fungos do gênero *Candida*

A PCR em tempo real surgiu como outra possibilidade de uso de ferramentas da biologia molecular para identificação e/ou diferenciação de espécies. Entretanto o foco nesse caso é outro. Não buscamos identificar um grande número de espécies diferentes, como no caso da RFLP, mas sim aplicar uma ferramenta para um grupo específico. Nesse caso, a vantagem em relação à RFLP é o tempo de execução e a possibilidade da quantificação da espécie na amostra dada.

Para o grupo de *C. palmiroleophila*, *P. guilliermondii* e *D. hansenii*, apesar de todas as variações do ensaio terem sido viáveis, as melhores condições para o ensaio de diferenciação/identificação das espécies em estudo foram *singleplex/multiplex* usando os DNAs isolados para cada espécie. A opção

multiplex pode ser muito útil principalmente quando se pretende trabalhar com coleções grandes ou estudos epidemiológicos extensos, pois reduz o custo operacional, não apenas por economizar reagentes, mas também por empregar menos placas, filmes, ponteiras, tempo de processamento, etc. Mas independente da configuração do ensaio, essa abordagem seria uma forma de validar os achados da microbiologia clássica para fungos dessas espécies, uma vez que os achados morfológicos e bioquímicos são muito semelhantes entre elas (Desnos-Ollivier, 2008).

Essa mesma discussão é válida para *C. rugosa*. Entretanto, não testamos a possibilidade multiplex, pois estávamos limitados pelas características do aparelho. Todos os testes realizados mostraram claramente diferenças entre as quatro espécies testadas, entretanto, a grande semelhança no padrão de assimilação leva ao erro de identificação quando se usa apenas os testes bioquímicos convencionais.

Uma melhor caracterização morfológica ou em condições extremas de cultivo certamente diminuirá a imprecisão das identificações ou ainda, o uso de ferramentas moleculares como as apresentadas aqui podem superar facilmente tais limitações.

5.3. Indução *in vitro* da transição dimórfica de *C. albicans*.

Qual o papel biológico da hifa? Outras perguntas derivadas da primeira são: como ocorre a formação da hifa? Por que o fungo filamenta? A filamentação é ativamente reprimida ou induzida?

A descrição da mudança morfológica do blastóporo que se diferencia para hifa é simples, inicialmente há um prolongamento em um dos pólos da célula, semelhante ao brotamento normal, entretanto não ocorre a septação

completa comum na gemulação, esse estado intermediário é definido como tubo germinativo. O tubo germinativo continua a se desenvolver e pode evoluir para dois tipos de filamentos, pseudo-hifa cujas constrições entre células adjacentes são visíveis e hifas verdadeiras cujas constrições não são observadas (Sudbery et al., 2004). Entretanto, a resposta em nível funcional de genes ativados ou reprimidos, metabolismo e necessidades nutricionais durante a transição é bem mais complexa e carece de informação.

Uma explicação razoável sobre o papel biológico da hifa é conferir ao fungo a capacidade de dispersão, entretanto a observação de que fungos deficientes em transitar da forma leveduriforme para a micelial em geral apresentam baixa patogenicidade tem classificado esta capacidade como um importante fator de virulência (Alonso-Monge et al., 2002).

O projeto foi inicialmente pensado sob esse prisma: tentar explicar a ocorrência da hifa como fator de virulência do fungo e não como estrutura de que proporciona capacidade de dispersão em resposta a mudança nas condições ambientais e ainda, permitir a adaptação em diferentes nichos, uma vez que clamidoconídeos (esporo de resistência originado por brotamento a partir da hifa) são freqüentemente observados no estado micelial do fungo.

Os primeiros pilotos de ensaios voltados para induzir a filamentação de *C. albicans* estiveram centrados na obtenção de um meio definido independente de SFB. Entretanto, resultados obtidos nos testes de fracionamento do SFB (discussão abaixo) e dados da literatura nos forçaram a reformular o plano inicial.

Em primeiro lugar, mutantes que filamentam de forma constitutiva, como os mutantes *tup1*, são avirulentos quando testados em modelo murino

(Navarro-Garcia et al. 2001; Alonso-Monge et al. 2003); em segundo lugar, um duplo mutante de *C. albicans* CKY138 (*efg1/efg1 cph1/cph1*) que não filamenta sob as condições padrões e são avirulentos em camundongo, filamentaram normalmente quando embebidos no ágar e ainda, promoveram lesões com filamentos em língua de porco gnotobiótico rescén-nascido (Riggle et. al. 1999). Trabalhos anteriores demonstraram que *C. albicans* possui a capacidade de redirecionar o crescimento da hifa em resposta às características do ambiente, como fendas, rachaduras ou orifícios, fenômeno este denominado tigmotropismo (Kumamoto, 2004; Odds e Path, 1994). Quando cultivada embebida no ágar, técnica de *puor plate*, *C. albicans* filamenta em meio comum, independente da presença de indutor químico. O gene CZF1 (*Candida* Zinc Finger 1), que codifica um fator de transcrição, está envolvido nessa regulação (Brown et. al. 1999).

Em conjunto, esses dados mostram prováveis vias redundantes e independentes (Riggle et al., 1999) e ainda, tem sido postulado que não apenas uma ou outra forma vegetativa seja crucial para se determinar a virulência do fungo, mas sim a habilidade que o fungo tem de transitar entre essas formas conferindo a este vantagem adaptativa em diversos sítios anatômicos do hospedeiro e/ou outras vias metabólicas relacionadas à virulência sejam disparadas paralelamente a este processo (Hube, 2004; Yang, 2003).

Os ensaios de filamentação e invasão foram repensados, buscamos associar fatores físicos e químicos o que difere da idéia original, pensada inicialmente apenas através de indutores químicos da filamentação. O primeiro modelo testado foi a utilização da membrana do ovo de codorna (*Nothura*

maculosa). A pergunta que fizemos para esse teste foi simples, o fungo seria capaz de filantar e atravessar a membrana na presença ou ausência de indutor químico?

Como resultado, macroscopicamente observou-se a formação de lesões, semelhantes às encontradas nas infecções cutâneas e mucocutâneas, por toda a superfície do ovo. A avaliação por microscópica óptica e eletrônica de varredura revelou formas filamentosas abundantes com brotamento de clamidoconídeos lateral e apical da hifa. Entretanto, essa manifestação só foi observada no sistema contendo SFB. No sistema contendo apenas WO, houve crescimento do fungo, mas não houve a diferenciação para hifa.

A substituição da membrana biológica por uma sintética objetivou dirimir alguns pontos questionáveis, por exemplo, não temos como dimensionar se o tratamento com ácido acético para remover a casca calcificada pode acarretar alguma alteração química na membrana do ovo, interferindo de alguma forma na resposta biológica; ainda, o processamento do ovo para a remoção da casca é trabalhoso o que dificultaria sua reprodutibilidade, podendo o ensaio ser facilmente contaminado por outros fungos ou bactérias.

Entretanto, existem aspectos positivos nesse ensaio, como a avaliação da capacidade de aderência do fungo ao substrato, a sua capacidade de transpor uma barreira física e a possibilidade de associação entre as características do substrato e indutores químicos da filamentação.

O modelo é promissor, e as membranas de nitrocelulose trouxeram vantagens como a manipulação mínima do material, favorecendo o procedimento estéril; as características físicoquímicas da membrana são

constantes, pois não existe a etapa de preparo como o da membrana biológica e o ensaio pode ser mais facilmente reproduzido.

Outra vantagem que ainda não foi explorada é a modificação controlada da membrana com banhos sucessivos em soluções contendo fatores indutores ou inibidores da filamentação. O desenvolvimento do ensaio está no início, mas os resultados preliminares indicam um grande potencial a ser explorado.

As membranas com os três tamanhos de poros, 3, 5 e 8 micrômetros foram positivas no teste de filamentação. Repetindo o resultado observado no teste da membrana biológica, em meio WO sem adição de SFB não houve a formação de hifas. Entretanto, quando mudamos o meio base para YPD ou Chrom Agar, o fungo filamentou mesmo sem a adição de SFB. Nesses dois meios de cultura, quando o fungo cresce diretamente na superfície do ágar, sem a presença de membrana ou indutor químico, este cresce na forma de levedura, não filamenta e não invade o ágar.

A observação feita em WO permite especular sobre as causas prováveis da inibição na formação de hifas. A composição do meio mínimo (carente de uma série de moléculas presentes no meio rico YPD ou no meio suplementado com SFB) pode ser um fator limitante. Ou ainda, observamos uma acidificação pronunciada do meio (variando de um pH 7,5 para 3,5 em 16h) nessa condição de cultivo (WO).

Samaranayake et al., (1983), reportaram resultado semelhante onde a redução do pH do meio suplementado com 0,1 M de dextrose ou sacarose era decorrente da secreção ácida principalmente de acetato e em menor quantidade de fumarato, piruvato e propionato.

Uma explicação possível para esse fenômeno é ativação da via do glioxilato. Vários genes associados a esta via são superexpressos quando o fungo é fagocitado por macrófagos em cultura (Lorenz e Fink, 2001) ou quando o fungo é cultivado em sangue total ou em contato com neutrófilos a partir do fracionamento do sangue total (Fradin e Hube, 2006). A via é ativada provavelmente como fonte alternativa de energia em ambientes com privação nutricional, pois habilita o fungo a utilizar ácidos graxos ou acetilcoenzima A para a produção de glicose (Lorenz e Fink, 2001). Portanto, a ausência de hifas em nosso modelo deve ser resultante da carência nutricional do meio utilizado uma vez que glicose é essencial para a síntese de macromoléculas necessárias para a proliferação do fungo, entre elas ribose e desoxirribose.

As análises das membranas e do ágar contendo hifas indicam um mesmo modelo de invasão, onde inicialmente apenas as hifas atravessam a membrana e invadem o ágar e em seguida ocorreram brotamentos laterais e apicais favorecendo a dispersão do fungo no meio de cultura.

Esse modelo de invasão foi publicado recentemente por grupos diferentes (Dalle et. al. 2010; Zhu e Filler, 2010), apesar de terem desenvolvido uma metodologia distinta da nossa, uma vez que utilizaram cultura celular em monocamada. No entanto, os resultados apresentados, morfologicamente, são muito semelhantes aos nossos. Nesse modelo é possível observar as características de adesão, transição dimórfica e penetração ativa do epitélio, algo que até então não era possível com as metodologias tradicionais.

Esses modelos vão além, não mostram apenas a ultraestrutura do mecanismo, sinalizam a dinâmica funcional do processo, onde o fungo é capaz de penetrar ativamente o epitélio algo que até recentemente não era bem

compreendido (Andrutis et. al. 2000). Zhu e Filler (2010) sugerem ainda que o fungo induza a auto-endocitose onde uma adesina presente na parede do fungo Als3 se liga a E-caderina, uma proteína do cito esqueleto ativando a via de endocitose dependente de clatrina.

O que esses modelos não mostram, no entanto, é o que ocorre do outro lado do epitélio, algo que conseguimos ver com o ensaio da membrana, seja biológica ou sintética, ao romperem a barreira física, as hifas iniciam um processo de brotamento em suas constrições laterais ou na região apical.

A avaliação morfológica e funcional do sistema de estudo da transição dimórfica que estamos propondo nos pareceu bastante consistente com os dados descritos na literatura e resolvemos testá-lo frente à outra característica sugerida como parte importante da transição dimórfica, a adesão do fungo ao substrato.

A adesão do fungo ao substrato (referido aqui como qualquer superfície de contato seja ela membrana, dispositivos médicos ou epitélio do hospedeiro) envolve um grande número de moléculas como carboidratos, proteínas, ou combinações entre essas. A adesão é a etapa inicial da formação de uma estrutura complexa, o biofilme, e há uma correlação direta entre a capacidade de formar o biofilme e o grau de virulência de um isolado (Yang, 2003; Masuoka, 2004).

Em um passado recente, a parede celular dos fungos, em especial *Candida* sp. era considerada uma estrutura pouco dinâmica que conferia a forma final ao fungo e ainda, por sua rigidez conferia proteção aos esferoplastos (Chaffin et al, 1998). Essa visão, no entanto, vem mudando consideravelmente. A composição da parede celular pode variar entre as

espécies; em *C. albicans* é composta principalmente de carboidratos, seguida de proteínas e lipídios e é através dela que as células fúngicas interagem entre si, com o substrato ou com o epitélio, formando uma estrutura complexa e dinâmica, o biofilme (Masuoka, 2004; Soll, 2008).

Tal interação ocorre em dois níveis, aquele entre o fungo e o substrato (adesão) e célula-célula (coesão), formando uma estrutura em camadas sobre determinada superfície (Soll, 2008). A família de proteínas Als (Agglutinin-like sequence) é um dos alvos principais dos estudos sobre a capacidade de adesão e biofilme (Blankenship e Mitchell, 2006). Oito proteínas dessa família já foram caracterizadas em *C. albicans*. A primeira proteína (Als1) foi caracterizada em 1995 e a partir desta foi possível caracterizar todas as outras, pois possuem similaridade estrutural (Hoyer, 2001).

Essas proteínas estão complexadas com a membrana através de âncoras de glicosil fosfatidil inositol (GPI) e são altamente glicosiladas. A caracterização dessas proteínas mostrou grande similaridade com uma glicoproteína de adesão expressa por *S. cerevisiae*, a α -aglutinina. Em *S. cerevisiae*, a interação entre α -aglutinina e outra glicoproteína de adesão, a-aglutinina, facilitam o cruzamento entre as células haplóides (Hoyer, 2001).

A avaliação da expressão dos oito genes dessa família é importante para o sistema que estamos propondo. Os resultados são preliminares, pois inicialmente buscamos apenas um panorama geral de como o estresse a que estamos submetendo o fungo atua nas características morfológicas, metabolismo e em nível de expressão gênica de alguns marcadores que já possuem dados publicados a partir de testes *in vitro* e *in vivo*. Assumimos o risco de usar o sistema SYBR Green conscientes das limitações e ressalvas,

entretanto há o benefício de poder analisar um grande número de variáveis a um custo acessível e planejar os próximos ensaios com base em dados reais usando um sistema mais sensível e confiável.

As vinte situações estabelecidas visaram à exposição do fungo a diferentes estresses e ainda, poder avaliar a diferença entre o cultivo do fungo em um determinado meio de cultura com e sem a membrana. Para essa família de genes, os dados podem ser avaliados em conjunto. Os genes ALS têm a expressão regulada de forma diferente que pode depender do meio de cultura, o estado morfológico do fungo e ainda o tempo de cultivo. Uma vez que todos os genes dessa família estão envolvidos com adesão e coesão, em situações que favorecem o crescimento do fungo como células planctônicas (caldo WO e YPD), observamos uma expressão mínima ou inexistente para todos os genes da família.

Os genes ALS2, 4, 5, 6, 7 e 9 mantiveram esse padrão em todas as condições testadas. Consistente com esse resultado já foi demonstrado que ALS6, 7 e 9 se ligam a um grupo restrito de substratos e não estão envolvidos com a adesão a células epiteliais (Hoyer, 1998; Green et al., 2004; Sheppard et al., 2004). ALS2 não foi detectado em uma grande variedade de situações e alguns autores sugerem instabilidade do transcrito, ser um pseudo gene ou necessitar de algum indutor *in vivo* para sua expressão. ALS4 está envolvido na adesão ao epitélio, entretanto é expresso em uma fase tardia da cultura, algo que não foi testado em nosso modelo (Hoyer 1998).

Já foi demonstrado que ALS5 desempenha função importante na aderência em vários substratos diferentes, incluindo células epiteliais orais do hospedeiro (Sheppard, 2004). Entretanto, em nosso ensaio a expressão desse

gene manteve-se em nível basal mínimo. Essa diferença pode estar relacionada a diversos fatores. ALS5 possui um polimorfismo de sequência entre diferentes linhagens de *C. albicans*, superior a dos outros genes da família que apesar de não ter sido demonstrado, pode ter influências em nível funcional; já foi documentando que há diferença na regulação linhagem-específica de genes dessa família onde o mesmo gene responde a diferentes sinais regulatórios; e ainda, um provável mecanismo compensatório, onde a expressão de um gene da família regula a expressão do outro (Hoyer, 2001; Zhu e Filler, 2010)

O perfil de expressão para os genes ALS1 e 3, no entanto, apresenta um comportamento aparentemente oposto, pois onde um estava com a expressão aumentada, o outro estava com a expressão diminuída. As diferenças mais significativas foram para a superexpressão de ALS1 nas células recuperadas da face do inóculo (FI) dos sistemas onde o meio foi WO ou YPD; na membrana do cultivo em YPD suplementado com SFB e nas células coletadas do meio subjacente (F2) à membrana quando o cultivo ocorreu apenas em SFB puro. Para ALS3 os sistemas SFB caldo, FI WO suplementado com SFB, membrana do sistema contendo YPD e F2 do sistema YPD mais SFB.

Com exceção do WO e YPD caldo, em todos os outros sistemas houve uma diferença no padrão de expressão entre esses dois genes. ALS1 e 3 estão fisicamente separados, o primeiro no cromossomo 6 e o segundo no cromossomo R. Esses dois genes apresentam uma grande similaridade estrutural e a expressão pode variar com o meio de cultivo ou a cepa para ALS1, ou a forma celular para ALS3, expresso apenas na fase micelial do fungo (Hoyer, 1998). Entretanto, possuem função redundante, sendo

necessários pelo menos dois alelos funcionais de um dos genes para o processo de adesão e formação do biofilme (Nobile et al., 2008).

O processo inicial da adesão ainda conta com outra proteína, Hwp1 (Hyphal wall protein 1), descoberta em 1996 e caracterizada como a primeira proteína expressa exclusivamente na fase micelial do fungo. Essa proteína tem uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e glutamina, e está ligada à parede celular por âncora de GPI, completamente orientada para fora da célula, motivo pelo qual não foi possível prever domínios transmembrana em sua estrutura (Staab et al., 1996).

Hwp1 media a aderência às células do epitélio oral do hospedeiro por um mecanismo único, a região N-terminal da proteína mimetiza substratos (proteínas pequenas ricas em prolina) para uma transglutaminase associada às células epiteliais. A ligação covalente com o sítio catalítico da enzima seria a etapa inicial da adesão e em seguida outras proteínas e carboidratos da parede do fungo forneceriam o arcabouço para outras moléculas de adesão completarem a união entre as estruturas do fungo e o tecido do hospedeiro (Staab et al., 2004).

Em *C. albicans*, resultados recentes sugerem que há um possível mecanismo de coesão envolvendo as proteínas Als, em especial Als1 e 3, e Hwp1 formando ligações heterotípicas entre células adjacentes, uma vez que Hwp1 é expressa em células *mating type a*, mas não em α (Soll, 2008). Assim essas proteínas atuariam como adesinas complementares, mas com função diferente àquela de *S. cerevisiae*, voltada para dar suporte à aderência do biofilme e tal sistema de interação pode ter evoluído de aglutininas inicialmente relacionadas ao *mating* de *C. albicans* (Nobile et al., 2008; Soll, 2008).

Em nosso sistema modelo usando Millipore, provavelmente essa proteína não desempenha função de adesão, pois a membrana carece de transglutaminase, entretanto, pode desempenhar a função de coesão através das ligações heterotípicas com Als1p e Als3p. Observamos o aumento de sua expressão tanto nos sistemas contendo apenas o indutor químico (SFB) quanto o físico (membrana) ou na combinação de ambos.

Esse resultado nos levou a perguntar se diferentes fatores de indução poderiam levar a vias redundantes na expressão desses genes. Avaliamos a expressão do fator de transcrição CZF1 (Candida zinc finger 1), descrito originalmente como um provável fator de transcrição envolvido na regulação do crescimento micelial em resposta às condições físicas do ambiente (Brown et al., 1999).

Nossos resultados sugerem uma expressão constitutiva com aumento significativo principalmente em WO ou WO FI. Essa observação foi de certa forma inusitada, pois esperávamos um aumento na expressão nas condições em que o fungo foi exposto à membrana. Entretanto, confrontando os resultados obtidos com a literatura vimos que CZF1 é transcritionalmente regulado em resposta a diferentes condições como temperatura, pH, fase pós-exponencial da cultura ou ainda, expresso em altos níveis quando o cultivo é feito em caldo e o crescimento celular extingue as fontes fermentáveis de carbono, como glicose, privilegiando o metabolismo oxidativo, conhecido como transição *diauxie* na levedura (Vinces et al., 2006). Essa explicação é coerente com a observação feita principalmente para o aumento na expressão do gene nas condições WO e ainda, WO FI.

Avaliamos ainda a abundância de transcritos do gene ECE1 (*Extent Cell Elongation* 1). A expressão desse gene não é detectada quando o fungo cresce na fase leveduriforme, entretanto começa a ser detectada após 30 minutos em ensaios de indução do estado micelial (Birse et al., 1993). Apesar de ter sido demonstrado que esse gene é altamente expresso na fase micelial do fungo, a função da proteína não é conhecida, a deleção desse gene não acarreta consequências morfológicas ao fungo quando induzido a filamentosar (Birse et al., 1993; Bastidas et al., 2009).

Observamos uma correlação direta no aumento da expressão desse gene nas condições em que o fungo desenvolveu o estado micelial. É importante observar que no sistema de membrana, tanto em F1 quanto F2 existe uma coexistência tanto de hifas quanto de leveduras, e é difícil quantificar o quanto cada uma dessas formas contribui, em massa e quantidade de cDNA e RNA, para o resultado final.

A realização do ensaio ELISA foi a última etapa idealizada para avaliação da metodologia de indução da transição dimórfica *in vitro* de *C. albicans*. Imaginamos um padrão de resposta positivo ou negativo claro para esse ensaio, entretanto os anticorpos anti-Hwp1 se ligaram a outras proteínas do extrato total de células planctônicas. O resultado é inesperado, pois já está fartamente documentado que nesse estado não há expressão de HWP1; aparentemente a quantidade do “ligante” liberada em cada um dos sobrenadantes é praticamente a mesma, inclusive no precipitado final, com pequena diferença no sobrenadante 2, o que pode indicar um artefato do teste. Entretanto, o controle negativo iniciado unicamente com PBS (e tratado

conforme as demais amostras) apresentou a mesma emissão do branco na leitura da placa.

Em relação às células induzidas em SFB, o resultado é mais coerente, uma vez que a proteína está complexada com a parede celular, a lise mecânica já deve ser suficiente para liberar no tampão de lise uma grande quantidade de epitopos suficiente para a detecção pelo ensaio. Ainda, as lavagens sucessivas diminuem a quantidade de proteína restante na lisado total. As amostras contaminadas com uma concentração sabida da proteína recombinante indicam a estabilidade do extrato analisado, aparentemente livre de inibidores e/ou proteases.

Analisando a metodologia de dois trabalhos que utilizaram o ensaio ELISA para detecção de anticorpos anti-Hwp1p percebemos diferenças que podem influenciar na sensibilidade do ensaio (Lain et al., 2006; Naglik et al., 2006). Em ambos os trabalhos os pesquisadores sensibilizaram a placa com 100 ng da proteína recombinante diluída em tampão carbonato de sódio pH 9.6. Para a sensibilização, Naglik et al. (2006) incubou a placa a 37°C 1h e o bloqueio com BSA ocorreu a 4°C pela noite e a diluição do soro de coelho contendo os anticorpos primários anti-Hwp1 foi muito superior: 1:8000.

Com protocolo diferente, Lain et al. (2006) sensibilizou a placa a 4°C pela noite e o bloqueio ocorreu a 37°C por 1h. A diluição do soro também foi maior que a utilizada em nosso trabalho, 1:1000; e ainda, acrescentaram Tween 20 no tampão de incubação para uma concentração final de 0,05%, o que aumenta a especificidade da ligação anticorpo-antígeno.

Aumentar a concentração do epitopo para sensibilizar a placa e diminuir a concentração do anticorpo primário com tampão de incubação contendo

Tween 20 poderá resolver o problema da leitura inespecífica, considerando a possibilidade de ser um artefato do ensaio. Além dessa estratégia, vamos tentar o ensaio de imunofluorescência indireta (Garcia-Ruiz, 1997). Nesse ensaio usaremos um anticorpo secundário conjugado com FITC e microscopia de fluorescência.

Caso seja necessário, recorreremos a duas outras estratégias, a primeira é melhorar a qualidade de extração das proteínas da parede celular usando o protocolo que emprega o ácido trifluorometanosulfônico (Maddi et al., 2009). A vantagem desse protocolo é que a quebra da parede celular ocorre através da matriz de carboidrato e ainda deglicosila as proteínas. Por último, fazer Western blot com os extratos totais dos blastóporos e do micélio para ver se está ocorrendo ligação inespecífica do anticorpo com alguma outra proteína da parede celular.

Os testes que iniciamos nesse trabalho estão voltados a estudar situações controladas onde podemos mudar as condições de cultivo de um ou dos dois lados da membrana e ver como o fungo responde a tais alterações. Obviamente, há sempre o interesse em comparar os resultados obtidos em tais condições com aqueles relacionados aos achados clínicos. Grande parte das infecções sistêmicas ocorrem em decorrência da formação do biofilme em catéteres venosos ou sondas de demora (Blankenship e Mitchell, 2006), podendo dessa forma, liberar as formas fúngicas diretamente na circulação. Entretanto, a capacidade de atravessar uma determinada barreira física já foi observada em modelo animal, sendo responsável pela infecção sistêmica a partir de lesões do trato gastrointestinal (Andrutis et al., 2000). Assim, essa pode

ser uma via provável pela qual o fungo consegue atingir a circulação sanguínea e se disseminar para os outros órgãos do corpo.

5.4. Fracionamento do soro fetal bovino.

A indução da fase micelial de *C. albicans* com SFB é um modelo clássico empregado no estudo da transição dimórfica. O SFB possui um nível muito baixo de anticorpos, sendo considerado em certos aspectos muito semelhante ao soro de pacientes imunossuprimidos, entretanto, com maior nível de fatores de crescimento. É fato que ele possui a capacidade de induzir o estado micelial de *C. albicans*, contudo temos observado que na rotina laboratorial ao utilizar lotes diferentes há a necessidade de variar a concentração do soro entre 10 e 20% (v/v) para continuar induzindo a filamentação. Essa observação pode refletir uma diferença em sua composição, principalmente em relação ao fator indutor (ou fatores) da transição dimórfica, ou ainda, fator(s) inibidore(s).

Por ser uma mistura complexa, até os dias atuais nenhuma abordagem conseguiu caracterizar exatamente quais são os compostos ativos que agem sobre a morfologia do fungo e aqui cabem duas ponderações. A primeira é sobre quais componentes disparam a mudança de levedura para hifa. A segunda é mais sutil: por que ocorre a diminuição (dependendo da concentração do soro na mistura soro/meio de cultura) ou a inexistência de crescimento de células planctônicas quando o cultivo é SFB puro? É correto afirmar que o mesmo mecanismo que induz a filamentação inibe o crescimento celular? Ou são eventos independentes conduzidos por diferentes substâncias?

Para responder questões como essa, propomos a separação do soro em frações distintas, certamente enriquecidas com substâncias selecionadas, conforme a metodologia empregada (carga, tamanho ou hidrofobicidade). Testamos cada uma das frações obtidas e observamos quais frações atuam sobre a morfologia do fungo.

A constatação de que frações ricas em albumina induziam a filamentação em *C. albicans* nos levou a questionar se a albumina por si só seria capaz de induzir o processo. Entretanto, Feng et al. (1999) com estratégia semelhante a nossa, encontrou resultados similares e concluíram que o fator indutor não é a albumina, mas trata-se de um problema de co-purificação. Essa afirmação é condizente com a observação de que lotes diferentes do soro necessitam de quantidades distintas para induzir a filamentação. Entretanto, os autores não discutem se o indutor estaria de alguma forma complexado com a albumina, algum tipo de ligante bem como a sua natureza química.

A albumina é a proteína mais abundante do plasma, desempenha várias funções biológicas importantes entre elas a de transporte de ácidos graxos do fígado para os tecidos. Possui ainda alta capacidade de se ligar covalente ou reversivelmente a um grande número de compostos endógenos ou exógenos com alta afinidade e ainda pode servir como fonte de aminoácidos para a célula (Sharman et al., 2004). Devido a todas essas características se realmente existir algum ligante da albumina responsável por induzir a filamentação do fungo, a sua purificação não será tarefa fácil.

Apesar de não ter sido possível avançar no fracionamento do soro, a abordagem serviu para solidificar a idéia da existência de diferentes substâncias que induzem no fungo respostas distintas, como o fenômeno da

floculação, observada em frações diferentes daquela que induziu a filamentação.

A floculação está relacionada à superexpressão da proteína Als1p, função esta análoga à Flo11p de *S. cerevisiae* (Sundstrom, 2002). Entretanto, ainda não é possível responder qual componente do soro induz a superexpressão dessa proteína e ainda, qual a consequência biológica, uma vez que a filamentação foi observada de forma independente dessa superexpressão.

Adiante, tentaremos duas abordagens, a primeira é testar albuminas com diferentes graus de pureza. A segunda é avaliar por PCR em tempo real nas células cultivadas a expressão dos mesmos genes monitorados nos testes da membrana, após exposição às frações que alteraram a morfologia do fungo. Essas duas abordagens podem fornecer pistas sobre a consistência dos achados e nos incentivar a determinar a natureza química da molécula ativa e ainda da via que está sendo regulada sob aquela determinada condição.

5.5. Como se inicia a transição comensal-patogênico?

A busca pela caracterização da transição dimórfica e das vias acionadas durante essa transição almeja trazer luz para o paradigma de como um fungo que convive de forma comensal na flora microbiológica de 70% da população passa a ser patogênico podendo inclusive levar o hospedeiro à morte. Os modelos desenvolvidos até os dias de hoje, voltados para o estudo da infecção *in vivo* ou *in vitro*, tem demonstrado variáveis múltiplas onde não raramente o padrão de resposta de fungo muda conforme o sistema ou hospedeiro. E ainda, todos esses modelos, incluindo o desenvolvido nesse trabalho tentam explicar como o processo ocorre, mas não como ele se inicia, ou seja, o que dispara a

transição dimórfica no fungo (ou o bloqueio de um processo inibitório da transição dimórfica no fungo)

Considerando o grupo de risco para desenvolver micose sistêmica, a pergunta que tem sido feita é se o fungo seria capaz de perceber a fragilidade imune do paciente, *immunosensing*, e iniciar o processo de invasão (Kumamoto e Pierce, 2011), ou seja, se o paciente imunocomprometido produz algum tipo de sinalizador químico que ativa a transição dimórfica do fungo.

Trabalhos publicados recentemente apontam outro mecanismo que pode ser importante na manutenção do estado comensal do fungo que é a microflora equilibrada do hospedeiro. Jarosz et al., (2009) descreveu que *Streptococcus mutans*, uma bactéria Gran-positiva com alta prevalência em biofilme dental e considerado o principal agente da cárie exerce uma feito negativo na transição dimórfica através de um peptídeo que inibe a formação do tubo germinativo em *C. albicans*.

Nessa mesma linha de pesquisa, Hogan et al., (2004) demonstrou que uma homoserina lactona (HSL) com cadeia acil de 12 carbonos produzida por *P. aeruginosa* reprime completamente a filamentação de *C. albicans*. Os pesquisadores avaliaram ainda a expressão de três genes associados à fase micelial, HWP1, ECE1 e RBT1 (repressed by Tup1p) e observaram uma redução drástica no nível de expressão comparado com o controle. Testes com outras HSL com uma cadeia acil menor não tiveram o mesmo efeito.

Estas substâncias que atuam sobre a morfogênese não possuem atividade antifúngica e sua função ainda precisa ser mais estudada. A relação entre microorganismos e *Candida* trouxe informações importantes sobre a transição dimórfica. No entanto *C. albicans* tem a capacidade de auto-inibição

da forma micelial. Essa auto-regulação é feita através de uma molécula do sistema de *quorum-sensing* do fungo, o farnesol (Oh, et al., 2001).

Vários trabalhos têm investigado como estas moléculas atuam nas cascatas de sinalização e em nível de expressão gênica. Duas cascatas são muito bem estudadas e ao menos dois fatores de transcrição são fundamentais na expressão de genes associados à forma micelial, Cph1p (*Candida* pseudo hyphal regulator) pela cascata de sinalização MAP quinase (MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases) e Efg1p (elongation factor G) pela cascata de sinalização do AMP cíclico (cAMP: monofosfato cíclico de adenosina). As proteínas de adesão presentes na parede celular, Als1p e 3, Hwp1p e Ece1p, por exemplo, são reguladas por EFG1. Ambas as vias, MAPK e cAMP são reguladas por uma proteína G citosólica, Ras, homóloga à subunidade alfa da proteína G heterotrimérica (Biswas et al., 2007).

Há evidências de que o farnesol atua tanto na cascata MAPK quanto na cascata cAMP. Também, foi observado aumento do mRNA de TUP1 (um importante inibidor da via de filamentação) na presença do farnesol, um importante inibidor da via de filamentação. O farnesol parece atuar também diretamente na proteína Ras afetando a ligação Ras-Cyr1p uma adenilil ciclase, comprometendo a geração de cAMP (Shareck e Belhumer, 2011)

A homoserina lactona secretada por *P. aeruginosa* também atua sobre a cascata Ras-cAMP, provavelmente pelos mesmos mecanismos do farnesol. Portanto, a antibioticoterapia que reduz ou elimina a população dessas bactérias em geral pode, indiretamente, favorecer o aumento da população do fungo e diminuir a concentração de moléculas inibitórias da transição dimórfica de *C. albicans* (Kerr, 1994; Burns et al., 1999).

Entretanto, por outro mecanismo, a quebra do equilíbrio microbiológico na flora do hospedeiro pode atuar diretamente na morfogênese do fungo. Xu et al. (2008) demonstraram que peptídeoglicanos (PGN) derivados da parede de bactérias disparam a transição dimórfica de *C. albicans* ativando a via de sinalização cAMP/PKA por se ligar diretamente ao domínio LRR (leucine-rich-repeat) da Adenilil Ciclase Cyr1p, aumentando rapidamente a concentração celular de cAMP, independente de Ras. Certamente, a existência do domínio LRR em Cyr1p é algo notável, pois esse domínio é comum em proteínas envolvidas na imunidade inata seja de mamíferos, insetos ou plantas, capaz de reconhecer diversos ligantes associados aos patógenos, como peptídeoglicanos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas (Athman e Philpott, 2004; Xu et al., 2008).

Contudo, Xu et al., (2008), investigou apenas a ocorrência desses peptídeos no soro e não na flora epitelial. Os autores ainda discutem que a concentração desses PGN no soro é inferior à concentração necessária para promover a filamentação do fungo, sugerem assim, que no soro exista(m) ainda outro(s) fator(es) responsável(is) por esse fenômeno.

Em conjunto, esses dados sugerem que a relação equilíbrio/desequilíbrio da microflora do hospedeiro está relacionada com o estado comensal do fungo. Com a flora equilibrada, moléculas secretadas por bactérias manteriam a transição dimórfica de *C. albicans* inibida, o início de tratamentos com antibióticos reduziria a população de bactéria, diminuindo a concentração de tais inibidores e aumentando a concentração de PGN derivados da parede bacteriana o que favoreceria a transição dimórfica do

fungo. Entretanto, ainda falta estabelecer o papel do estado imune do paciente no início do processo de infecção.

6. Conclusão

1. O método de identificação baseado na PCR-RFLP se mostrou uma alternativa viável para o processo de identificação de fungos. Os resultados mostraram claramente que o número de espécies passíveis de identificação pode ser bem maior, o que futuramente o que aumentará sua abrangência.

2. A metodologia usando PCR em tempo real para caracterizar os grupos: *P. guilliermondii*, *C. palmioleophila* e *D. hansenii*; *C. rugosa*, *C. pararugosa*, *Candida* sp. SK 75 e *Candida* sp. L96D é uma alternativa rápida e confiável para a identificação e/ou diferenciação dessas espécies.

3. O ensaio para induzir in vitro a filamentação de *C. albicans*, independente de indutor químico se mostrou consistente e reprodutível, embora ainda falta caracterizar melhor o perfil da expressão de alguns genes associados à fase micelial do fungo.

4. A abordagem de fracionamento do SFB mostrou claramente a existência de mais de um fator que influencia na morfogênese do fungo. Contudo será preciso avançar mais no estudo para se caracterizar a natureza química dessas substâncias.

5. Destacaria que, dos resultados comentados acima, as contribuições mais importantes deste trabalho seriam:

5.1. O método da PCR-RFLP será um importante aliado nas rotinas de identificação e diferenciação das espécies fúngicas, suas características

são: simplicidade, praticidade, confiabilidade, identificação inequívoca e um excelente custo-benefício.

5.2. Identificamos duas novas espécies de *Candida*, e a descrição dessas espécies já está em fase de publicação.

5.3. Uma nova abordagem prática para se estudar in vitro a transição dimórfica de *C. albicans*, com a possibilidade de associar diferentes tipos de indutores e/ou inibidores neste modelo de ensaio e avaliar tanto a resposta morfológica do fungo, como expressão de genes e proteínas avançando no estudo das cascatas de sinalização que são ativadas ou inibidas durante essa transição.

5.4. Nossos dados indicam que no SFB existem diferentes moléculas que agem por vias distintas na morfologia do fungo.

Referências

- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Romàm, E., Eisman, B., Nombela, C., Pla, J. (2003) Strategies for the identification of virulence determinants in human pathogenic fungi. *Cur. Genet.* **42**:301-312
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410
- Anderson, E.E., Pappin. A., Pavia, A.T. (1998) Spontaneous intestinal perforation in premature infants: a distinct clinical entity associated with systemic candidiasis. *J. Pediatr. Surg.* **33**:1463-1467
- Anderson, J.B., Wickens, C., Khan, M., Cowen, L.E., Federspiel, N., Jones, T., Kohn, L.M. (2001). Infrequent genetic exchange and recombination in the mitochondrial genome of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **183**:865-872.
- Andrutis, A. A., Riggle, P.J., Kumamoto C.A., Tzipori, S. (2000) Intestinal lesions associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2317-2323
- Angenent, L.T., Kelley, S.T., St Amand, A., Pace, N.R., Hernandez, M.T. (2005) Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**:4860-5.
- Athman, R., Philpott, D. (2004). Innate immunity via toll-like receptors and Nod proteins. *Cur. Opinion Microbiol.* **7**:25-32.
- Bastidas, R.J., Heitman, J., Cardenas, M.E. (2009). The protein kinase Tor1 regulates adhesion gene expression in *Candida albicans*. *Plos Pathog.* **5**:e1000294.
- Bendtsen, J.D., Henrik, N., Heijne, G., Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**:783-795

- Birse, C.E., Irwin, M.Y., Fonzi, W.A., Sypherd, P.S. (1993). Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. **61**:3648-3655.
- Biswas, S., Dijk, P.V., Dattai, A. (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:348–376
- Blankenship, J.R., Mitchell, A.P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Cur. Opinion Microbiol.* **9**:588-594.
- Bonito, G., Isikhuemhen, O.S., Vilgalys, R. (2010). Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. *Bioresouce Technology.* **101**:1021-1027.
- Brown, D.H.Jr., Giusani, A.D., Chen, X., Kumamoto, C.A. (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique gene CZF1. *Mol. Microbiol.* **34**:651-662.
- Burns, J., Van Dalfsem, J., Shawar, R., Otto, K., Garber, R., Quan, J. (1999) Effect of intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **179**:1190-1196.
- Butinar, L., Strmole, T., Gunde-Cimerman, N. (2011). Relative incidence of ascomycetous yeasts in arctic coastal environments. *Microb. Ecol.* **61**: 832-843.
- Carvalho, A.A., Rodrigues, F.J. (2006). DNA fragments, primers and method for amplification of the DNA fragments and kit including the aforementioned primers for the detection and identification of clinically relevant *Candida* species. World Intellectual Property Organization WO 2006/123295 A2.
- Chaffin, W.L., López-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martínez, J.P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:130-180.

- Chen, Y., Eisner, J.D., Kattar, M.M., Barrett, S.L.R., Lafe, K., Bui, U., Limaye, Ajit, P., Cookson, B.T. (2001) Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeast. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4042-4051
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. (2002). An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int. Dairy J.* **12**:407-411.
- Dalle, F., Wächter, B., Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Duncan, W., Labruère, C., Bonnin, A., Hube, H. (2010) Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular Microbiol.* **12**:248-271
- Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, V., Raoux, D., Gantier, J.C., Domer, F. (2008) *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a Rare Human Fungal Pathogen often Misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *J. Clin. Microbiol.* **46**:3237-3242.
- Dias, M.V.S. (2003) Novos transposons para construção de fusão com GFP em *Candida albicans*: um estudo fenotípico e de localização da septina Cdc3. Dissertação do programa de mestrado em Biologia Celular e Molecular – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP
- Donnelly S.M., Sullivan, D.J., Shanley, D.B., Coleman, D.C. (1999). Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology.* **145**: 1871-82.
- Fell J.W. (1993). Rapid identification of yeast species using three primers in a polymerase chain reaction. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**:174 - 80.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.

- Feng, Q., Summers, E., Guo, B., Fink, G. (1999) Ras Signaling Is Required for Serum-Induced Hyphal Differentiation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**:6339-6346.
- Fradin, C., Hube, B. (2006). Transcriptional profiling of *Candida albicans* in human blood. *Microbe.* **1**:76-80.
- Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C., Hube, B. (2003). Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* **47**:1523-1543.
- Gaillard, C., Strauss, F. (1990) Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Research.* **18**:378.
- García-Ruiz, J.C., Arilla, M.C., Regúlez, P., Quindós, G., Álvarez, A. Pontón, J. (1997). Detection of Antibodies to *Candida albicans* Germ Tubes for Diagnosis and Therapeutic Monitoring of Invasive Candidiasis in Patients with Hematologic Malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 1997:3284-3287.
- Green, C.B., Cheng, G., Chandra, J., Mukherjee, P., Ghannoum, M.A., Hoyer, L.L. (2004). RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology.* **150**:267-275.
- Groenewald, M., Smith, M.T. (2010). Re-examination of strains formerly assigned to *Hyphopichia burtonii*, the phylogeny of the genus *Hyphopichia*, and the description of *Hyphopichia pseudoburtonii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**:2675-2680.
- Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:454-500.
- Hogan, D.A., Vik, A., Kolter, R. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* **54**:1212-1223.

- Hoyer, L.L., Payne, T.L., Hecht, J.E. (1998). Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of Als proteins to the fungal cell surface. *J. Bacteriol.* 180:5334-5343.
- Hoyer, L.L. (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9:176-180.
- Hube, B. (2004). From commensal to pathogen: stage and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Cur. Opin. Microbiol.* 7:336-341
- Jarosz, L.M., Deng, D.M., Mei, H.C., Crielard, W., Krom, B.P. (2009). *Streptococcus mutans* Competence-Stimulating Peptide Inhibits *Candida albicans* Hypha Formation. *Eukaryotic Cell.* 8:1658-1664.
- Jordan, J.A., (2000). PCR identification and quantification of important *Candida* species. United States Patent 6,017,699.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules, pp. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, NY.
- Kerr, J.R. (1994) Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 32:525-527
- Koneman, E.W., Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C. Diagnóstico Microbiológico. Texto e atlas colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 1565p.
- Kumamoto, C. (2004). A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 5576-5581
- Kumamoto, C.A., Pierce, J.V. (2011) Immunosensing during colonization by *Candida albicans*: does it take a village to colonize the intestine? *Trends in Microbiol.* 19:263-267.
- Lain, A., Elguezabal, N., Brena, S., Garcia-Ruiz, J.C., Palacio, A., Moragues, M.D., Pontón, J. (2007). Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-

linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein I.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. **23**:2947-2948.
- Li, J., Xu, Y.C., Bai, F.Y. (2006). *Candida pseudorugosa* sp. Nov., A Novel Yest Species from Sputum. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4486-4490.
- Liguori, G., Lucariello, A., Colella, G., De Luca, A. Marinelli, P. (2007) Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J. Clin. Pathol.* **60**:1035–1039.
- Lorenz, M.C., Fink, G.R. (2001). The glyoxylate cycle is requerid for fungal virulence. *Nature*. **412**:83-86.
- Maddi, A., Bowman, S.M., Free, S.J. (2009). Trifluoromethanesulfonic acid-based proteomic analysis of cell wall and secreted proteins of the ascomycetous fungi *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. *Fungal Gent. Biol.* **46**:768-781.
- Mähnb, B., Stehr, F., Schäfer, W., Neuber, K. (2005) Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*. **48**:55-61
- Masuoka, J. (2004). Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:281-310.
- Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L. (1998). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*. **71**:491-499.
- Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M., Yamaguchi, H. (2006). A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important *Candida* species. *Jpn. J. Med. Mycol.* **47**: 225-229.

- Moran, G.P., Sanglard, D., Donnelly, S.M., Shanley, D.B., Sullivan, S.J., Coleman, D.C. (1998). Identification and expression of multidrug transporter responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Ant. Agente Chemo.* **42**: 1819-1830.
- Mota, A.J. (2007). Genotipagem por seqüenciamento e PCR-RFLP do DNA ribossomal e verificação da metodologia de identificação de possíveis fatores de virulência em sete espécies do gênero *Candida* – dissertação de mestrado, programa de pós-graduação em ciências biológicas, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP.
- Naglik, J.R., Fostira, F., Ruprai, J., Staab, J.F., Challacombe, S.J., Sundstrom, P. (2006). *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *J. Med. Microbiol.* **55**:1323-1327.
- Nailis, H., Coenye, T., Van Nieuwerburgh. F., Deforce. D., Nelis, H.J. (2006): Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Molecular Biology.* 7:25.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd ed. M27-A2. NCCLS, Wayne, Pa.
- Navarro-Garcia, F., Sanches, M., Nombela, C., Pla, J. (2001) Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev.* **25**:245-268
- Nobile, C.J., Schneider, H.A., Nett, J.E., Sheppard, D.C., Filler, S.G., Andes, D.R., Mitchell, A.P. (2008). Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm formation. *Cur. Biol.* **18**:1017-1024
- Odds F., Path M.R.C. (1994) Pathogenesis of *Candida* infections. *J. American Academy Dermatol.* **31**:S2-S5.
- Oh, K.B., Miyazawa, H., Naito, T., Matsuoka, H. (2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the

morphological transition in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**:4664-4668.

Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**:734-740.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:133-163.

Pujol, C., Pfaller, M.A., Soll, D.R. (2004). Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. *Ant. Agents Chemo.* **48**: 262-266.

Shareck, J., Belhumeur, P. (2011). Modulation of Morphogenesis in *Candida albicans* by Various Small Molecules. *Eukaryotic Cell*. 10:1004-1012.

Sharman, W.M., van Lier, J.E., Allen C.M. (2003). Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv. Drug Del. Rev.* **56**:53-76.

Simón, A.M.Q, Vidal, D.R, Esparducer, E.B, Huerta, To.G. (2000). Um método rápido para La identificación y caracterización de cepas y/o especies de levaduras y hongos filamentosos, baseado em el análisis de restricción del DNA mitocondrial. Oficina Española de Patentes Y Marcas. ES 2 052 446.

Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R., Kumamoto, C.A. (1999) Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect. Immun.* **67**:3649-3652.

Sadhu, Chanchal., McEachern, M. J., Rustchenko-Bulgac, E.P., Schmid, J., Soll, D.R., Hicks, J.B. (1991). Telomeric and dispersed repeats sequences in *Candida* yeasts and their use in strain identification. *J. Bacteriol.* **173**: 842-850

- Saitou N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Samaranayake, L.P., Guedes, D.A.M., Weetman, D.A., MacFarlane, T.W. (1983). Growth and acido production of *Candida albicans* in carbohydrate supplemented media. *Microbios.* **37**:105-115.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual (2nd Ed). Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, NY.
- Sandvén P. (1990) Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand.* **48**:27-36.
- Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., et al. (2004). Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J. Bio.l Chem.* **279**: 30840–30849
- Skinner, C.E, Fletcher, D.W. (1958) A review of the genus *Candida*. *Bacteriol. Rev.* **24**:397-416
- Soll, D.R. (2002) *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica.* **81**:101-110
- Soll, D.R. (2008). *Candida* biofilms: is adhesion sexy? *Cur. Biol.* **18**:R717-R720.
- Staab, J.F., Ferrer, C.A., Sundstrom, P. (1996). Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine-rich amino acid motif on a hyphal surfaces of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **271**:6298–6305
- Sudbery, P., Gow, N., Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **12**:317-324
- Sundstrom, P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cellular Microbiol.* **4**:461-469.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**:2731-2739.

- Tay, S.T., Tan, H.W., Na, S.L., Lim, S.L. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of two closely related subgroups of *Candida rugosa* in clinical specimens. *J. Med. Microbiol.* 60:1591-1597.
- Thanos, M., Schonian, G., Meyer, W., Schweynoch., Gräser, Y., Mitchell, T.G., Presber, W., Tietz, H.J. (1996). Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprint with PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 615-621.
- Vinces, M.D., Haas, C., Kumamoto, C.A. (2006). Expression of the *Candida albicans* Morphogenesis Regulator Gene CZF1 and Its Regulation by Efg1p and Czf1p. *Eukaryotic Cell.* **5**:825-835.
- White, T.B., Lee, S. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p 315-322. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (ed), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, USA.
- Williams, D.W., Lewis, M.A.O. (2000) Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* **6**:3-11.
- Xu, X.L., Lee, R.T.H., Fang, H.M., Wang, Y.M., Li, R., Aou, H., Zhu, Y., Wang, Y. (2008) Bacterial Peptidoglycan Triggers *Candida albicans* Hyphal Growth by Directly Activating the Adenylyl Cyclase Cyr1p. *Cell Host & Microbe.* **4**:28-39.
- Yang, Y.L. (2003) Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **36**:223-228.
- Zhu, W., Filler, S.G. (2010) Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cellular Microbiol.* **12**:273-282.

ANEXO I

Sequencias depositadas no GenBank, NCBI

LOCUS GU144663 2624 bp DNA linear PLN 25-NOV-2009

DEFINITION *Candida rugosa* strain ATCC 10571 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION GU144663

VERSION GU144663.1 GI:269784169

ORGANISM *Candida rugosa*
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales; *Candida*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2624)
AUTHORS Mota,A.J., Back-Brito,G.N. and Nobrega,F.G.
TITLE Description of a new species of *Candida* with biochemical and phenotypic pattern similar to *Candida rugosa*
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 2624)
AUTHORS Mota,A.J., Back-Brito,G.N. and Nobrega,F.G.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-OCT-2009) Bioscience, UNESP, Av. Francisco Jose Longo, Sao Jose dos Campos, SP 12201970, Brazil

FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..2624
/organism="Candida rugosa" /mol_type="genomic DNA"
/strain="ATCC 10571" /culture_collection="ATCC:10571"
/db_xref="taxon:5481"
/PCR_primers="fwd_seq: gcatatcaataagcggaggaaaag,
rev_seq: tcctccgcttattgatatgc"
/PCR_primers="fwd_seq: gcatcgatgaagaacgcagc,
rev_seq: tgatccttctgcagggttcacctac"
/PCR_primers="fwd_seq: aacctggttgatcctgccagt,
rev_seq: ggtccgtgtttcaagacg"

rRNA <1..1745
/product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 1746..1814
/product="internal transcribed spacer 1"

rRNA 1815..1969
/product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 1970..2097
/product="internal transcribed spacer 2"

rRNA 2098..>2624
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN
1 aacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct
61 aagtataagc aattgtacgg tgaaactgcg aatggctcat taaatcagtt atcgtttatt
121 tgatagtacc ttactacttg gatattctag gtaattctag agctaataca tgcttacagc
181 cccgacttct ggaagggcgc agttttattag ataaaaagcc gacgttggtg gtgattcatg
241 ataacctttc gaatcgcgag taatcgcgat gggttcattca aatttctgcc ctatcaattg
301 aaccgtaggg tagtggccta cggtgatttc tacgggtaac ggggaataag gggttcgattc
361 cggagagggg gcctgagaaa cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgcaaatta
421 cccaatcccg acacggggag gtagtgacaa taaataacga tgcggggcac gtatgtgttt
481 cgcaattgga atgagtacaa tgtaaatacc ttaacgagga acaattggag ggcaagcctg
541 gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca aaagcgtata ttaaagtgtg tgcagttaaa
601 aagctcgtag ttgattttcg acgcattcga ggggtccact tcggtgcgta ctctgagggt
661 gcgtttttctc tggggcgcct tgcggcaagc cagactgtta ctttgaaaaa attagagtgt
721 tcaaagcggg cgatagcttg aatatattag catggaataa tagaatagga cggatggatc
781 tattttgttg gtttctagaa ccatcgtaat gattaatggg catcggcggg ggcacggtg
841 ttcaaagtgc agaggtgaaa ttcttggtt atttgaagac caactgctgc gaaagcgttt
901 gccagggaga ttgccgtcaa tcaagaacga aagttagggg atcgaagatg atcagatacc
961 gtcgtagtcc taaccgtaaa cgatgccgac tagggatcgg gtggcgttca tttctgactc
1021 actcggcacc ttaggagaaa tcaaagtctt tgggttcttg ggggagtagt gtcgcaaggc
1081 tgaaacttaa agggattgac ggaagggcac caccaggagt ggagcctgcg gcttaatttg
1141 actcaacacg ggaaaactca ccagggtccag acacaataag gattgacaga ttgagagctc


```

1201 tttcttgatt ttgtgggtgg tgggtgcatgg ccgttcttag ttggtggagt gatttgtctg
1261 cttaattgcg ataacgaacg agaccttaac ctgctaacta gggcgcccg cgcttgccggg
1321 ggagctcttc ttagaggggac catcggtttc aagccgaagg aagtttgagg caataacagg
1381 tctgtgatgc ccttagacgt tctggggccg acgcgcgcta cactgacgga gccagcgagt
1441 ctaccttttg cgagaggcat gggaaatctt gtgaaactcc gtcgtgctgg ggatagagca
1501 ttgcaattgt tgctcttcaa cgaggaattc ctagtaagcg caagtcacta gcttgcggtg
1561 attacgtccc tgccctttgt acacaccgcc cgctcgctact accgattgaa tggcttagtg
1621 aggcacgcgg agtggccggc gtagaggcg acctcttgcc tggccgcaaa ccttgtcaaa
1681 cttgggtcatt tagagggaagt aaaagtcgta acaaggtttc cgtaggtgaa cctgcggaag
1741 gatcattaca acaacaatac aacttttgtt ctgaacaata acttcaagta ccgatcatca
1801 aattgtttaa aaaaaacttt caacaacgga tctctaggtt ctgcgcatga tgaagaacgc
1861 agcgaaatgc gatacgtagt acgaaacgca agtcgtgaat catcgaatct ttgaacgcac
1921 attgcgctgt gtggcattcc gcacagcatg cctgtttgag caatatttct ctctcgcaag
1981 gtgttgggca ccacgcggc aggcgtctgc ccgaaacgc accgtctaaa acagttaagc
2041 ttgttacaga ctcacgatct tattctcaaa tcaggtagga ctaccgcgtg aacttaagca
2101 tatcaataag cggaggaaaa gaaaccaacc gggattgcct cagtaacggc gagtgaagcg
2161 gcaacagctc aaatttgaaa gcccgcggc gttgtaattt gcaggcggat gttttggggc
2221 gggcgctgtc tacgttcctt ggaacaggac gccgcagagg gtgagagccc cgtgcgatgg
2281 cgctccaac cgcgtaaaac tccgccgacg agtcgagttg tttgggaatg cagctccaag
2341 tgggtggtaa attccatcta aagctaaata ctggcgagag accgatagcg aacaagtaca
2401 gtgatgaaa gatgaaaagc actttgaaaa gagagtgaaa cagcacgtga aattgttgaa
2461 aggggaagggt atgcgattag cggccagcag gaggtgcctt ctctgtaaaa ggccgtgcac
2521 cgtcttcgga caccgtgcgc ggagatggcg agggggcgcc tgaggtctgc gactcgaggt
2581 tgctggcgta atgattgcat accaccgctc ttgaaacacg gacc

```

//

```

LOCUS      GQ176145                2629 bp    DNA        linear    PLN 27-JUN-2009
DEFINITION Candida sp. SK75 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; nternal
transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer
2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  GQ176145
VERSION    GQ176145.1  GI:241017723
SOURCE     Candida sp. SK75
ORGANISM   Candida sp. SK75 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic
Saccharomycetales; Candida.
REFERENCE  1 (bases 1 to 2629)
AUTHORS    Mota,A.J., Back-Brito,G.N., Khouri,S. and Nobrega,F.G.
TITLE      Description of a new species of Candida with biochemical and
phenotypic pattern similar to Candida rugosa
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 2629)
AUTHORS    Mota,A.J., Back-Brito,G.N., Khouri,S. and Nobrega,F.G.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (19-MAY-2009) Bioscience, UNESP, Av. Francisco Jose
Longo, Sao Jose dos Campos, SP 12201970, Brazil
FEATURES   Location/Qualifiers
source     1..2629
            /organism="Candida sp. SK75" /mol_type="genomic DNA"
            /strain="SK75"
            /isolation_source="patient with ulcerated lesion"
            /host="Homo sapiens" /db_xref="taxon:653680"
            /PCR_primers="fwd_seq: aacctggttgatcctgccagt,
                        rev_seq: ggtccgtgtttcaagacg"
            /PCR_primers="fwd_seq: gcatatcaataagcggaggaaaaag,
                        rev_seq: tcctccgcttattgatatgc"
            /PCR_primers="fwd_seq: gcatcgatgaagaacgcagc,
                        rev_seq: tgatccttctgcaggttcacctac"

rRNA<1..1750
            /product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA   1751..1815
            /product="internal transcribed spacer 1"
rRNA       1816..1970
            /product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA   1971..2101
            /product="internal transcribed spacer 2"
rRNA       2102..>2629
            /product="28S ribosomal RNA"

```

ORIGIN

```

1 aacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct
61 aagtataagc aattgtacgg tgaaactgcg aatggctcat taaatcagtt atcgtttatt
121 tcatagtacc ttactacttg gatattctag gtaattctag agctaataca tgcttacagc
181 cccgactttt ggaaggggag agttttattag ataaaaagcc gactctgttg gtgattcata
241 ataaccattc gaatcgcatt gccttgggct ggcatggtt cattcaaatt tctgccctat
301 caattgaacc gtagggtagt ggcctacggt gatttcaacg ggtaacgggg aataagggtt
361 cgattccgga gagggagcct gagaaacgac taccacatcc aaggaaggca gcaggcgcgc
421 aaattaccca atcccgcacac cggggaggta gtgacaataa ataacgatac gggaccata
481 cggctctgta attggaatga gtacaatgta aatacctaag aggaacaatt ggagggcaag
541 cctggtgcca gcagccgagg taattccagc tccaaaagcg tatattaag ttgttgagc
601 taaaaagctc gtagttgaat ttaggcggga cgactaggtc tcagcgatga gtacttaaga
661 gtgcgccctc ctctggggcg cttcggcaag ccagactgtt actttgaaaa aattagagtg
721 ttcaaagcgg gcgattgctt gaatatatta gcatggaata atagaatagg acggatggat
781 ctattttgtt ggtttctaga accatcgtaa tgattaatgg gcatcggcgg gggcatcgg
841 attcaaagt cagaggtag attccttgat tatttgaaga ccaactgctg cgaaagcgtt
901 tgccaaggag attgccgtca atcaagaacg aaagttaggg gatcgaagat gatcagatac
961 cgtggtagtc ctaaccgtaa acgatgccga ctagggatcg ggtggcgttc ttttttgac
1021 tcaactcgga ccttaggaga aatcaaagtc tttgggttct ggggggagta tggtcgcaag
1081 gctgaaactt aaaggaattg acggaaggcg accaccagga gtggagcctg cggcttattt
1141 gactcaacac gggaaaactc accaggtcca gacacaataa gtgattgaca gattgagagc
1201 tctttcttga ttttgtgggt ggtggtgcat ggccgttctt agttggtgga gtgattgtc
1261 tgcttaattg cgataacgaa cgagacctca acctgctaac tagggcagcc cgcttttgcg
1321 ggggtgtgct tcttagagg accatcggtt tcaagccgaa ggaagtttg ggaataaca
1381 ggtctgtgat gcccttagac gttctgggac gcacgcgcgc tacactgacg gagccagcga
1441 gtgtaccttt gccgagaggc atgggaaatc ttgtgaaact ccgtcgtgct ggggatagag
1501 cattgcaatt gttgctcttc aacgaggaat tcctagtaag cgcaagtcac tagcttgcgt
1561 tgattacgtc cctgcccttt gtacacaccg cccgtcgcta ctaccgattg aatggcttag
1621 tgaggcctcc ggatcagccg gtgagggggg cgacccttag actggcggag aagctggtca
1681 agcttggtca tttagaggaa gtaaaagtcg taacaagggt tccgtaggtg aacctcgga
1741 aggatcatta caataacact tagcattgtg tccacacaaa ttaaccttaa ccataatac
1801 aattgtttta gtcaaaactt tcaacgacgg atctctaggt tctcgcatcg atgaagaacg
1861 cagcgaatg cgatacgtag tacgaaacgc aagtcgtgaa tcatcgaatc tttgaacgca
1921 cattgcgctg tgtggcattc cacacagcat gcctgttga gcgtccttc tctctcgcat
1981 tgcggtgatg ggaggcactc tgggaagcgt cctctcgaaa cggagcagcc acgactgtta
2041 gtgtagtcgc cggcttttga acgtcgacct caaatcaggt aggagtaccc gctgaactta
2101 agcatatcaa taagcggagg aaaagaaacc aactgggatt gccttagtaa cggcgagtga
2161 agcggcaaca gctcaaattt gaaagccctc gggcggttga atttgaggga ggaagtgtt
2221 gggcggtgac tgtctacgtt ccttggaaca ggacgccgca gagggtgaga gccccgtgcg
2281 atggcacctc taaccgggta aaactcccc gacgagtcga gttgtttggg aatgcagctc
2341 caagtgggtg gtaaatcca tctaaagcta aatacaggcg agagaccgat agcgaacaag
2401 tacagtgatg gaaagatgaa aagcactttg aaaagagagt gaaacagcac gtgaaattgt
2461 tgaaagggaa gggatgacga ttagcggcca gcggggagga gagggtcgtg aaaaggcccg
2521 gcaccgtcct cggacactgt gcgcggagat ggcgacgctt tcctcgagc ctgcgaatac
2581 taggtcgctg gcgtaatgat tgcataccac ccgtcttgaa acacggacc

```

//

LOCUS GQ139517 2732 bp DNA linear PLN 20-JUN-2009

DEFINITION *Candida pararugosa* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION GQ139517

VERSION GQ139517.1 GI:239916547

SOURCE *Candida pararugosa*

ORGANISM *Candida pararugosa*
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales; *Candida*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2732)

AUTHORS Mota,A.J., Back-Brito,G.N., Matos,B.M. and Nobrega,F.G.

TITLE Use of molecular techniques for identification and differentiation of *Candida* species

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 2732)

AUTHORS Mota,A.J., Back-Brito,G.N., Matos,B.M. and Nobrega,F.G.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (09-MAY-2009) Bioscience, UNESP, A. Francisco Jose

Longo, Sao Jose dos Campos, SP 12201970, Brazil

FEATURES
 source 1..2732
 /organism="Candida pararugosa" /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="oral cavity" /db_xref="taxon:49331"
 /PCR_primers="fwd_seq: aacctggttgatcctgccagt,
 rev_seq: tcctccgcttattgatatgc"
 /PCR_primers="fwd_seq: gcatatcaataagcggaggaaaag,
 rev_seq: tgatccttctgcagggttcacctac"
 /PCR_primers="fwd_seq: gcacgatgaagaacgcagc,
 rev_seq: ggtccgtgtttcaagacg"

rRNA<1..1776
 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 1777..1851
 /product="internal transcribed spacer 1"

rRNA 1852..2024
 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 2025..2145
 /product="internal transcribed spacer 2"

rRNA 2146..>2732
 /product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 aacctggttg atcctgccag tagtgtatgc ttgtctcaaa gattaagcca tgcattgatc
61 agtataagca ataatacagt gaaactgcga atggctcatt aaatcagtta taatctatct
121 gatcgatatt gctagatgga taaccctggc aattctagag ctaatacacg aaaaaacacg
181 gatttccgtg gtgttcatta gattcaaaaa ccaatgcttc ggctttatgg tgattcatga
241 tgacctctcg aagcgtgtgc cttgtgctac gctgggtcat tcgaatttct gccctatcaa
301 ctttcgatgg tacggtatg gctaccatg gtttcgacgg gtaacgggga attagggttc
361 gattccggag aaggagcatg agacacggct cctacatcca tggaaggcag caggcgcgca
421 aattacccaa tcctgacacg gggaggtagt gacaagaaat aacggcacag ggcctttggg
481 cttgtgatcg gaatgagaac aattaatttt acttatcgag gaacaattgg agggcaagtc
541 tgggtgccagc agccgcggta attccagctc caatagcgta cattaaagtt gttgcagtta
601 aaaagctcgt agttgaattt tgggtttttc agcgggggtc acctaacggt gcgttactct
661 tatggcaagc ctttttcctg gacgccctgc tgcgtttaac cgcgtggtg ggaaggctag
721 gacatttact gtgaggaaat tagagtgttc aaagcaggcg ttatgctcga atatattagc
781 atggaataat agaataagac gtatggtttt attttgttgg tttctagaac cgtcgtaatg
841 attaacagga gcagtcgggg gcgctagtag tcatcagtag gaggtgaaat tcttaaacct
901 gatgaagact aactactgag aaagcattcg ccaaggatgt tttcattaat caagaacgaa
961 agttggggga tcgaaaacga tcagataccg ttgtagtctc aaccgtaaac gatgccgact
1021 cgggagtcga ggagtgaat aattagcttt ttcggcaccg tgtgagaaat caaagttttt
1081 gggctctggg gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaaa ggaattgacg gaagggcacc
1141 accaggagtg gagcctgcgg cttatttgac tcaacacggg gaaactcacc aggtccagac
1201 acaataagga ttgacagatt gagagctctt tcttgatttt gtgggtggtg gtgcatggcc
1261 gttcttagtt ggtggagtga tttgtctgct taattgcatg aacgaacgag acctgactc
1321 ttaaataggg tgtataacaa tttgttgtat gattcttctt aagaggacta tcaggaaaaa
1381 cctgatggag gttcgaggca ataacaggtc tgtgatgccc ttagacgttc tgggccgcac
1441 gcgcgctaca ctgatacagc cagcgagtct ataccctgtg ccgagaggac taggtaatct
1501 tgttaaacct tatcgtgctg gggatagagc tttgcaattt ttgctcttga acgaggaatt
1561 cctagtaagc gcaagtcacg agcttgctgt gattacgtcc ctgccctttg tacacaccgc
1621 ccgtcggtac taccgattga atgacttagt gaagcctttg gacgtgcgat tgatgagggc
1681 gacctctgcc gttgtacgaa aattggatga acttgccatg ttagaggaaag tacaagtcgt
1741 aacaaggttt ccgtaggtga accttcggaa ggatcattat agattttattg atactttgtg
1801 aaacaaatga taagctttat gcgaaatact ttttattaat ttagtctaata acgaaaaaaa
1861 tcaaaacctt taacaatgga tctcttggtt ctcgatcga tgaagaacgc agcaaagcgc
1921 gatagataat gtgaattgca gacgtgaatc attgagtttt tgaacgcaca ttgcacctct
1981 ttggagtgtg tactttgtgt agcgtcattt tttctccaca tatatattag tgggtaattg
2041 ttcactatat ggactgaaaa agattataca cagttgttag acacaagctg tggaaaatta
2101 tcaaattttg acctcatatc aagtaagatc acccgctgaa ctttaagcata tcaataagcg
2161 gaggaaaaga aaccaacagg gattccctta gtaacggcga gtgaaccggg aaaagctcaa
2221 atttgaaatc tgccaacagg ccgagttgta atttgtagat ggctacactg cataatagta
2281 gatgctcaag ttctttggaa aaagacatca tggagggtga caatcccgtg aggcattgta
2341 ctaggagcat atagtgggct ttctaagagt cgagttgttt gggaatgcag ctcaaagtgc
2401 gtgggtgaata ccatgtaaag ctaaaatagg acgagagacc gatagcgaac aagtagctg
2461 aaggaaagat gaaaagcact ccgaaaggag agtgaaatag tacgtgaaat tgttaagtg
2521 gaagggtctg agatcagaat tggtagtttg ggttccacgt cctcttgggg gcgtgtactc
2581 cctttccacc gggccagcgg gagtttcgtc tcttgggtaa aagcagtgga atgtagcagc
2641 ttgtctgtat tatagcctct gttcatacaa gacgtcgaga cttgtttttg ttggcgtaat
2701 ctctagc caccgctctt gaaacacgga cc

```

ANEXO II

Figura 48. Mapas de restrição editados com o MapDraw™ para a enzima *DdeI*. Os mapas apresentados aqui são de: A, *Aspergillus fumigatus*; B, *Aspergillus nidulans*; C, *Candida fructos*; D, *Cryptococcus neoformans*; E, *Mucor racemosus*, F, *Pichia myanmaensis*; G, *Rhizopus oryzae*.

ANEXO III

Tabela: Comparação entre os resultados dos diferentes métodos de identificação.

Nº	Linhagem	Identificação clássica	API 20C AUX Espécie% T			Sequenciamento	PCR-RFLP
1.	FCF 14	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 2	99,5	0,25	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2.	FCF 14,1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 1	97,2	0,72	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
3.	ATCC 10231	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 1	97,2	0,72	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4.	LGMG2A	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
5.	LGMG2B	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
6.	LGMG2C	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
7.	LGMG3A	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i> / <i>inconspicua</i>	98,9	0,91	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
8.	LGMG3B	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i> / <i>inconspicua</i>	98,9	0,91	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
9.	LGMG3D	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i> / <i>inconspicua</i>	98,9	0,91	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
10.	ICB06	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>	94,2	0,54	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
11.	LGMG4B	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>	84,3	1,0	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
12.	H585	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>	88,5	0,49	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
13.	LGMG4E	<i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i>	60,3	0,83	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
14.	ICB 15	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	98,9	0,39	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
15.	LGMG5C	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> <i>C. neoformans</i>	DI DI	DI DI	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
16.	LGMG5D	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	91,6	0,61	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
17.	LGMG7A	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. famata</i>	99,7	0,97	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
18.	LGMG7B	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	70,2	0,72	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
19.	FCF 426	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	60,8	0,71	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
20.	LGMG 8 ^a	<i>C. glabrata</i>	<i>C. pelliculosa</i>	79,1	0,69	<i>C. subpelliculosa</i>	<i>C. subpelliculosa</i>
21.	LGMG 8B	<i>C. krusei</i>	<i>C. pelliculosa</i>	79,1	0,69	<i>C. subpelliculosa</i>	<i>C. subpelliculosa</i>
22.	004/01	<i>C. albicans</i>	<i>P. norvengensis</i>	96,5	0,74	<i>P. norvengensis</i>	<i>P. norvengensis</i>
23.	004/03	<i>C. albicans</i>	<i>P. norvengensis</i>	96,5	0,74	<i>P. norvengensis</i>	<i>P. norvengensis</i>
24.	LGMG 10C	<i>P. norvengensis</i>	<i>P. norvengensis</i>	96,5	0,74	<i>P. norvengensis</i>	<i>P. norvengensis</i>
25.	LGMG 12 ^a	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. krusei</i>	39,9		<i>C. lipolytica</i>	<i>C. lipolytica</i>
26.	L96D	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>	98,1	0,72	<i>Candida</i> sp	<i>C. mesorugosa</i>
27.	BMM 35C	Não identificada	Não identificada	-	-	<i>E. dermatitides</i>	<i>E. dermatitides</i>
28.	BMM 29 ^a	Não identificada	<i>T. inkin</i>	-	-	<i>T. inkin</i>	<i>T. inkin</i>
29.	BMM 29B	Não identificada	<i>T. inkin</i>	-	-	<i>T. inkin</i>	<i>T. inkin</i>
30.	BMM 29C	Não identificada	<i>T. inkin</i>	-	-	<i>T. inkin</i>	<i>T. inkin</i>
31.	BMM 29D	Não identificada	<i>T. inkin</i>	-	-	<i>T. inkin</i>	<i>T. inkin</i>
32.	BMM30A	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>	97,7	0,38	<i>C. pararugosa</i>	<i>C. pararugosa</i>
33.	BMM30B	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>	79,8	0,71	<i>C. pararugosa</i>	<i>C. pararugosa</i>
34.	BMM30C	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>	79,8	0,71	<i>C. pararugosa</i>	<i>C. pararugosa</i>
35.	BMM30D	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>	97,7	0,38	<i>C. pararugosa</i>	<i>C. pararugosa</i>
36.	SK 75	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>	97,1	0,93	<i>Candida</i> sp	<i>C. metarugosa</i>
37.	SK 76	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>	97,1	0,93	<i>Candida</i> sp	<i>C. metarugosa</i>
38.	ATCC 62894	<i>C. famata</i>	<i>P. guilliermondii</i> <i>C. famata</i>	60,3 39,6	0,83 39,6	<i>C. palmioleophila</i>	<i>C. palmioleophila</i>
39.	LGMG 1D	<i>C. krusei</i>				<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
40.	ICB 58	<i>C. albicans</i>				<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
41.	ATCC 14053	<i>C. albicans</i>				<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
42.	UNESP 15D	<i>C. albicans</i>				<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

43.	LGMG 1H	<i>P. guilliermondii</i>				<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
44.	LGMG 1J	<i>C. albicans</i>				<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
45.	LGMG 1K	<i>C. albicans</i>				<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
46.	LGMG 2E	<i>C. krusei</i>				<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
47.	ATCC 2001	<i>C. glabrata</i>				<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
48.	LGMG 4B	<i>P. guilliermondii</i>				<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
49.	H1020	<i>P. guilliermondii</i>				<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
50.	ATCC 6260	<i>P. guilliermondii</i>				<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>
51.	LGMG 5A	<i>C. albicans</i>				<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
52.	LGMG 5E	<i>C. krusei</i>				<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
53.	LGMG 5F	<i>P. guilliermondii</i>				<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
54.	LGMG 5G	<i>C. tropicalis</i>				<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
55.	LGMG 5H	<i>P. guilliermondii</i>				<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
56.	LGMG 5I	<i>C. krusei</i>				<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
57.	LGMG 5J	<i>C. krusei</i>				<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
58.	LGMG 5K	<i>C. albicans</i>				<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
59.	LGMG 5L	<i>P. guilliermondii</i>				<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
60.	LGMG 6 ^a	<i>C. tropicalis</i>				<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
61.	LGMG 7D	<i>C. tropicalis</i>				<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
62.	LGMG 7E	<i>C. albicans</i>				<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
63.	ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>				<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
64.	ATCC 40197	<i>P. anomala</i>				<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>
65.	ATCC 40050	<i>C. inconspicua</i>				<i>C. inconspicua</i>	<i>C. inconspicua</i>
66.	ATCC	<i>C. intermedia</i>				<i>C. intermedia</i>	<i>C. intermedia</i>
67.	ATCC 4156	<i>C. zeylanoides</i>				<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. zeylanoides</i>
68.	ATCC 40139	<i>C. stellata</i>				<i>C. stellata</i>	<i>C. stellata</i>
69.	ATCC 36239	<i>D. hansenii</i>				<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i>
70.	Mg 27	<i>M. gypseum</i>				<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
71.	80SP	<i>M. gypseum</i>				<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
72.	USP474	<i>M. gypseum</i>				<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
73.	DR 25	<i>M. gypseum</i>				<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
74.	169SP	<i>M. gypseum</i>				<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
75.	RO349	<i>M. gypseum</i>				<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
76.	MEG13	<i>M. gypseum</i>				<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
77.	CD33		<i>C. dubliniensis</i>	99,9	0,69	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
78.	CD36		<i>C. dubliniensis</i>	99,9	0,69	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
79.	USP777		<i>C. famata</i>	99,9	0,72	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
80.	ATCC778157		<i>C. dubliniensis</i>	99,9	0,69	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
81.	08D		<i>C. sphaerica</i>	99,2	0,66	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
82.	21A		<i>S. cerevisiae</i>	98,7	1,00	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
83.	21B		<i>S. cerevisiae</i>	93,5	0,88	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
84.	21C		<i>S. cerevisiae</i>	99,9	0,94	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
85.	21D		<i>S. cerevisiae</i>	93,5	0,88	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
86.	SK 18		<i>S. cerevisiae</i>	81,2	0,92	<i>C. kefir</i>	<i>C. kefir</i>
87.	SK 19		<i>H. polymorpha</i>	-	-	<i>O. thermophila</i>	<i>O. thermophila</i>
88.	SK 21		<i>T. asahii</i>	99,9	0,9	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
89.	SK 92		<i>T. asahii</i>	99,9	0,9	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
90.	1A	<i>C. albicans</i>	<i>P. guilliermondii</i>	60,3	0,83		<i>P. guilliermondii</i>
91.	1B	<i>C. albicans</i>	<i>P. guilliermondii</i>	84,3	1,0		<i>P. guilliermondii</i>
92.	1C	<i>C. albicans</i>	<i>P. guilliermondii</i>	84,3	1,0		<i>P. guilliermondii</i>
93.	1D	<i>C. albicans</i>	<i>P. guilliermondii</i>	84,3	1,0		<i>P. guilliermondii</i>

94.	1X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	97,4	1,0		<i>C. albicans</i>
95.	3A	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
96.	3.B	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
97.	3.D	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
98.	5E	<i>C. krusei</i>	<i>C. norvegensis</i> <i>G. capitatum</i>	43,8 31,7	1,0 1,0		<i>C. krusei</i>
99.	5G	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i> / <i>inconspicua</i>	98,9	0,91		<i>C. krusei</i>
100	4.A (G)	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. guilliermondii</i>	84,3	1,0		<i>P. guilliermondii</i>
101	4.B (G)	<i>P. guilliermondii</i>	<i>C. famata</i> <i>P. guilliermondii</i>	62,6 37,2	0,65 0,55		<i>C. parapsilosis</i>
102	4.C (G)	<i>P. guilliermondii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	96,1	0,54		<i>C. parapsilosis</i>
103	4D (G)	<i>P. guilliermondii</i>	<i>C. albicans 1</i>	97,4	1,0		<i>C. albicans</i>
104	6A	<i>C. parapsilosis</i>	<i>P. guilliermondii</i>	60,3	0,83		<i>P. guilliermondii</i>
105	6B	<i>C. parapsilosis</i>	<i>P. guilliermondii</i>	60,3	0,83		<i>P. guilliermondii</i>
106	6C	<i>C. parapsilosis</i>	<i>P. guilliermondii</i>	60,3	0,83		<i>P. guilliermondii</i>
107	6N	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1		<i>C. glabrata</i>
108	7A	<i>C. tropicalis</i>	<i>P. guilliermondii</i>	60,3	0,83		<i>P. guilliermondii</i>
109	7C	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans 1</i>	68,8	0,65		<i>C. albicans</i>
110	7Q	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. famata</i> <i>C. laurentii</i>	84,8 8,6	0,68 0,52		<i>C. tropicalis</i>
111	7X	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. famata</i> <i>C. laurentii</i>	84,8 8,6	0,68 0,52		<i>C. tropicalis</i>
112	7Y	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. famata</i>	95,9	0,60		<i>C. tropicalis</i>
113	8D	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. famata</i>	98,2	0,92		<i>C. tropicalis</i>
114	SK 001		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
115	SK 002		<i>C. parapsilosis</i>	93,6	0,57		<i>C. parapsilosis</i>
116	SK 003		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
117	SK 004		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
118	SK 005		<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89		<i>C. tropicalis</i>
119	SK 006		<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89		<i>C. tropicalis</i>
120	SK 007		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,68		<i>C. parapsilosis</i>
121	SK 008		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
122	SK 009		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
123	SK 010		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
124	SK 011		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
125	SK 012		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
126	SK 013		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
127	SK 014		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
128	SK 015		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
129	SK 016		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
130	SK 017		<i>C. norvegensis</i> <i>G. capitatum</i>	43,8 41,4	1,0 1,0		<i>G. capitatum</i>
131	SK 020		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
132	SK 022		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
133	SK 023		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
134	SK 024		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
135	SK 025		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
136	SK 026		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
137	SK 027		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
138	SK 029		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
139	SK 030		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
140	SK 031		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>

141	SK 032		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
142	SK 033		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
143	SK 034		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
144	SK 035		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
145	SK 036		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
146	SK 037		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
147	SK 038		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86		<i>C. parapsilosis</i>
148	SK 039		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
149	SK 040		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>P. guilliermondii</i>
150	SK 041		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
151	SK 042		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
152	SK 043		<i>P. guilliermondii</i>	84,3	1,00		<i>P. guilliermondii</i>
153	SK 044		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
154	SK 045		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
155	SK 046		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
156	SK 047		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
157	SK 048		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
158	SK 049		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
159	SK 050		<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89		<i>C. tropicalis</i>
160	SK 051		<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89		<i>C. tropicalis</i>
161	SK 052		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
162	SK 053		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86		<i>C. parapsilosis</i>
163	SK 054		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
164	SK 055		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
165	SK 056		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
166	SK 057		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
167	SK 058		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
168	SK 059		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86		<i>C. parapsilosis</i>
169	SK 060		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
170	SK 061		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
171	SK 062		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
172	SK 063		<i>P. guilliermondii</i>	60,3	0,83		<i>P. guilliermondii</i>
173	SK 064		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
174	SK 065		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
175	SK 066		<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89		<i>C. tropicalis</i>
176	SK 067		<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89		<i>C. tropicalis</i>
177	SK 068		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
178	SK 069		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
179	SK 070		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
180	SK 071		<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89		<i>C. tropicalis</i>
181	SK 072		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
182	SK 073		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
183	SK 074		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
184	SK 077		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
185	SK 078		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
186	SK 079		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
187	SK 080		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,82		<i>C. parapsilosis</i>
188	SK 081		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
189	SK 082		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
190	SK 083		<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89		<i>C. tropicalis</i>
191	SK 084		<i>P. guilliermondii</i>	99,7	0,99		<i>P. guilliermondii</i>

192	SK 085		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
193	SK 086		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
194	SK 087		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
195	SK 088		<i>C. krusei</i> <i>/inconspicua</i>	96,2	1,00		<i>C. krusei</i>
196	SK 089		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86		<i>C. parapsilosis</i>
197	SK 090		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86		<i>C. parapsilosis</i>
198	SK 091		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
199	SK 093		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
200	SK 094		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
201	SK 095		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
202	SK 096		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
203	SK 097		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
204	SK 098		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,82		<i>C. parapsilosis</i>
205	SK 099		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,82		<i>C. parapsilosis</i>
206	SK 100		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00		<i>C. parapsilosis</i>
207	SK 101		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
208	SK 102		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,68		<i>C. parapsilosis</i>
209	SK 103		<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0		<i>C. tropicalis</i>
210	SK 104		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
211	SK 105		<i>C. albicans</i>	-	-		<i>C. albicans</i>
212	01 ANR A		<i>C. albicans</i> (1)	79,2	0,16		<i>C. albicans</i>
213	01 ANR C		<i>C. albicans</i>	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
214	02ANR A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
215	02ANR B		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
216	02ANR C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
217	02ANR D		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
218	04 ANP A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
219	04 ANP B		<i>C. albicans</i> (1)	88,9	0,4		<i>C. albicans</i>
220	04 ANP C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
221	04 ANP D		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
222	06 ANP A		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
223	06 ANP B		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
224	06 ANP C		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
225	06 ANP D		<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0		<i>C. glabrata</i>
226	07 ANP A		<i>C. albicans</i> (1)	98	0,58		<i>C. albicans</i>
227	07 ANP B		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
228	07 ANP C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
229	08 (1BN) A		<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,0		<i>C. parapsilosis</i>
230	08 (1BN) C		<i>C. parapsilosis</i>	92,9	0,72		<i>C. parapsilosis</i>
231	9 AN A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
232	10 (2BN) A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
233	10 (2BN) B		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
234	10 (2BN) C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
235	10 (2BN) D		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0,72		<i>C. albicans</i>
236	11ANBN A		<i>C. krusei</i> / <i>inconspicua</i>	98,9	0,91		<i>C. krusei</i>
237	11ANBN B		<i>C. krusei</i> / <i>inconspicua</i>	98,9	0,91		<i>C. krusei</i>
238	11 ANBN C		<i>C. tropicalis</i>	93,1	0,56		<i>C. tropicalis</i>
239	11 ANBN D		<i>C. albicans</i> (1)	79,2	0,16		<i>C. albicans</i>
240	11 ANBN E		<i>C. tropicalis</i>	70,2	0,72		<i>C. tropicalis</i>

241	12AN A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
242	12AN B		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
243	12AN C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
244	12AN D		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
245	12AN E		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
246	12AN F		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
247	12AN G		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
248	12AN H		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
249	13 ANP A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
250	13 ANP B		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
251	13 ANP C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
252	13 ANP D		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
253	14ANBN A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
254	14ANBN B		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
255	14 ANBN C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
256	14 ANBN D		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
257	14 ANBN E		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
258	16 ANBN A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
259	16 ANBN B		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
260	16 ANBN C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
261	17 ANBN A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
262	17 ANBN B		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
263	17 ANBN C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
264	19 ANBN A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
265	19 ANBN B		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
266	19 ANBN C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
267	20 ANBN A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
268	20 ANBN B		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
269	20 ANBN C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
270	20 ANBN D		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
271	21 ANBN A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
272	21 ANBN B		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
273	21 ANBN C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
274	21 ANBN D		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
275	21 ANBN E		<i>C. tropicalis</i>	93,1	0.56		<i>C. tropicalis</i>
276	21 ANBN F		<i>C. tropicalis</i>	93,1	0.56		<i>C. tropicalis</i>
277	23 ANBN A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
278	23 ANBN B		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
279	23 ANBN C		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
280	23 ANBN D		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
281	25 ANBN A		<i>C. albicans</i> (1)	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
282	25 ANBN B		<i>C. albicans</i> (1)	77,8	0.59		<i>C. albicans</i>
283	25 ANBN C		<i>C. albicans</i>	77,8	0.59		<i>C. albicans</i>
284	25 ANBN D		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
285	25 ANBN E		<i>C. albicans</i> (1)	98	0.58		<i>C. albicans</i>
286	25 ANBN F		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
287	26 ANBN A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
288	26 ANBN B		<i>C. albicans</i>	77,8	0.59		<i>C. albicans</i>
289	26 ANBN D		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
290	26 ANBN E		<i>C. albicans</i> (1)	98	0.58		<i>C. albicans</i>
291	26 ANBN F		<i>C. albicans</i>	98,2	0.87		<i>C. albicans</i>

292	28 ANBN A	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
293	28 ANBN B	<i>C. dubliniensis</i>	99,9	0,69	<i>C. dubliniensis</i>
294	28 ANBN C	<i>C. dubliniensis</i>	99,9	0,69	<i>C. dubliniensis</i>
295	28 ANBN D	<i>C. dubliniensis</i>	67,7	0.36	<i>C. dubliniensis</i>
296	29 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
297	29 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
298	29 ANBN C	<i>C. albicans (1)</i>	88,5	0.46	<i>C. albicans</i>
299	29 ANBN D	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
300	30 ANBN C	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
301	30 ANBN D	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
302	30 ANBN E	<i>C. parapsilosis</i>	98,5	0.61	<i>C. parapsilosis</i>
303	31 ANBN A	<i>C. dubliniensis</i>	67,7	0.36	<i>C. dubliniensis</i>
304	31 ANBN B	<i>C. dubliniensis</i>	99.9	0.69	<i>C. dubliniensis</i>
305	31 ANBN C	<i>C. dubliniensis</i>	99.9	0.69	<i>C. dubliniensis</i>
306	32 ANBN A	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
307	32 ANBN B	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
308	32 ANBN C	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
309	32 ANBN D	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
310	34 ANBN A	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
311	34 ANBN B	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
312	35 ANBN B	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
313	35 ANBN C	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
314	36 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
315	36 ANBN B	<i>C. albicans (1)</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
316	36 ANBN C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
317	37 ANBN A	<i>C. famata</i>	96	0.51	<i>C. albicans</i>
318	37 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
319	37 ANBN C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
320	39 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
321	39 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
322	39 ANBN C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
323	39 ANBN D	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
324	39 ANBN E	<i>C. albicans (1)</i>	93,9	0.59	<i>C. albicans</i>
325	42 ANBN A	<i>C. parapsilosis</i>	98,9	0.39	<i>C. parapsilosis</i>
326	42 ANBN C	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	0.72	<i>C. parapsilosis</i>
327	45 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
328	45 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
329	45 ANBN C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
330	46 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
331	46 ANBN B	<i>C. albicans</i>	98,2	0.87	<i>C. albicans</i>
332	46 ANBN C	<i>C. albicans</i>	98,2	0.87	<i>C. albicans</i>
333	48 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
334	48 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
335	49 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
336	49 ANBN B	<i>C. albicans</i>	98,2	0.87	<i>C. albicans</i>
337	50 ANBN A	<i>C. albicans</i>	98,2	0.87	<i>C. albicans</i>
338	50 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
339	50 ANBN C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
340	52 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
341	52 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
342	52 ANBN C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>

343	53 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
344	53 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
345	53 ANBN C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
346	55 ANBN A	<i>C. dubliniensis</i>	99	0.33	<i>C. dubliniensis</i>
347	55 ANBN B	<i>C. dubliniensis</i>	---	----	<i>C. dubliniensis</i>
348	56 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
349	57 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
350	57 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
351	57 ANBN C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
352	58 ANBN A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
353	58 ANBN B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
354	58 ANBN C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
355	01 Cont a	<i>C. dubliniensis</i>	91,9	0.47	<i>C. dubliniensis</i>
356	07 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
357	07 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
358	07 Cont C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
359	07 Cont D	<i>C. albicans</i>	98,2	0.87	<i>C. albicans</i>
360	10 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
361	10 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
362	10 Cont C	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
363	10 Cont D	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
364	12 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
365	12 Cont B	<i>C. albicans</i>	98,2	0.87	<i>C. albicans</i>
366	15 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
367	17 Cont A	<i>C. glabrata</i>	99.3	0.5	<i>C. glabrata</i>
368	17 Cont B	<i>C. glabrata</i>	99.3	0.5	<i>C. glabrata</i>
369	19 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
370	19 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
371	19 Cont C	<i>C. albicans</i>	98,2	0.87	<i>C. albicans</i>
372	21 Cont A	<i>C. krusei</i>	98,9	0.41	<i>C. krusei</i>
373	21 Cont A	<i>C. krusei</i>	98,9	0.41	<i>C. krusei</i>
374	21 Cont C	<i>C. dubliniensis</i>			<i>C. dubliniensis</i>
375	21 Cont D	<i>C. dubliniensis</i>	99.9	0.66	<i>C. dubliniensis</i>
376	23 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
377	23 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
378	24 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
379	24 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
380	25 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
381	25 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
382	26 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
383	28 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
384	28 Cont B	<i>C. tropicalis</i>	79,2	0.88	<i>C. albicans</i>
385	31 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
386	31 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
387	33 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
388	33 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
389	35 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
390	35 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
391	36 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
392	37 Cont A	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>
393	37 Cont B	<i>C. albicans</i>	97,2	0.72	<i>C. albicans</i>

394	39 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
395	40 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
396	40 Cont B		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
397	42 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
398	42 Cont B		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
399	43 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
400	45 Cont A		<i>P. guilliermondii</i>	60,3	0.83		<i>P. guilliermondii</i>
401	46 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
402	46 Cont B		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
403	48 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
404	50 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
405	50 Cont B		<i>C. albicans</i>	59,3	0.37		<i>C. albicans</i>
406	51 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
407	51 Cont B		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
408	52 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
409	52 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
410	54 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
411	54 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
412	56 Cont A		<i>C. glabrata</i>	99.3	1		<i>C. glabrata</i>
413	58 Cont A		<i>C. albicans</i>	97,2	0.72		<i>C. albicans</i>
414	Nufab 3		<i>C. glabrata</i>	29.2	0.9		<i>C. glabrata</i>
415	Nufab 5		<i>C. glabrata</i>	99.3	1.0		<i>C. glabrata</i>
416	Nufab 6		<i>C. glabrata</i>	15.0	0.4		<i>C. glabrata</i>
417	Nufab 6A1		<i>C. tropicalis</i>	-	-		<i>C. parapsilosis</i>
418	Nufab 11		<i>C. krusei</i>	98.9	0.91		<i>C. krusei</i>
419	Nufab 13		<i>C. tropicalis</i>	29.2	0.6		<i>C. tropicalis</i>
420	ATCC 157		<i>C. tropicalis</i>	29.8	0.43		<i>C. tropicalis</i>
421	LBM 001	<i>C. parapsilosis</i>					<i>C. parapsilosis</i>
422	LBM 003	<i>P. subpelliculosa</i>					<i>P. subpelliculosa</i>
423	LBM 004	<i>T. asahii</i>					<i>T. asahii</i>
424	LBM 005	<i>P. subpelliculosa</i>					<i>P. subpelliculosa</i>
425	ATCC 30070	<i>C. glabrata</i>					<i>C. parapsilosis</i>
426	USP 8987	<i>C. dubliniensis</i>					<i>C. dubliniensis</i>
427	USP 7988	<i>C. dubliniensis</i>					<i>C. dubliniensis</i>
428	222/02	<i>C. krusei</i>					<i>C. albicans</i>
429	227/02	<i>C. albicans</i>					<i>C. albicans</i>
430	212/02	<i>C. glabrata</i>					<i>C. glabrata</i>
431	215/02	<i>C. glabrata</i>					<i>C. glabrata</i>
432	218/02	<i>C. glabrata</i>					<i>C. glabrata</i>
433	192/02	<i>C. glabrata</i>					<i>C. glabrata</i>
434	42 ANBN B	<i>P. guilliermondii</i>					<i>P. guilliermondii</i>
435	ATCC 4135	<i>C. kefir</i>					<i>C. kefir</i>
436	ATCC 10663	<i>G. capitatus</i>					<i>G. capitatus</i>
437	YPH 499	<i>S. cerevisiae</i>					<i>S. cerevisiae</i>
438	ATCC	<i>T. mucoides</i>					<i>T. mucoides</i>
439	ATCC 40038	<i>C. parapsilosis</i>					<i>C. parapsilosis</i>
440	ATCC 40146	<i>C. lusitaniae</i>					<i>C. lusitaniae</i>
441	ATCC40199	<i>C. lipolytica</i>					<i>C. lipolytica</i>

ANEXO IV

Artigos Publicados

1. MOTA, A. J., BACK-BRITO, G. N., NOBREGA, F. G. Molecular identification of *Pichia guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida palmioleophila*. *Genetics and Molecular Biology*. v. online, p. ahead of print, 2011.
2. BREMENKAMP, CARIS, JORGE, A. O. C., BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., BALDUCCI, I., BRIGHENTI, FL, KOGA-ITO, C. Y. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Archives of Oral Biology*. , v.56, p.549 - 555, 2011.
3. Ribeiro PM, QUERIDO, S. M. R., BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., KOGA-ITO, C. Y, JORGE, A. O. C.
Research on *Candida dubliniensis* in a Brazilian yeast collection obtained from cardiac transplant, tuberculosis, and HIV-positive patients, and evaluation of phenotypic tests using agar screening methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. , v. 71, p. 81 - 86, 2011.
4. BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., VASCONCELLOS, T. C., QUERIDO, S. M. R., JORGE, A. O. C., REIS, A. S. M, BALDUCCI, I., KOGA-ITO, C. Y. Frequency of *Candida* spp. in Oral Cavity of Brazilian HIV-Positive Patients and Correlation with CD4 Cell Counts and Viral Load. *Mycopathologia* (1975, Print). v. 167, p. 81/2 - 87, 2009.
5. de ARAÚJO NAVAS, E.A., INOCÊNCIO, A. C., ALMEIDA, J.D., BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., JORGE, A. O. C., QUERIDO, S. M. R., BALDUCCI, I., KOGA-ITO, C. Y. Oral distribution of *Candida* species and presence of oral lesions in Brazilian leprosy patients under multidrug therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. v. 38, p. 764 - 767, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., TAKAMUNE, S. S., BERNARDES, L. A. S., PRADO, E. F. G. B., CORDAS, T. A., NOBREGA, F. G., KOGA-ITO, C. Y. Diversidade da microbiota fúngica bucal de pacientes com Anorexia e Bulimia Nervosas por métodos fenotípicos e moleculares In: 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2010, Águas de Lindóia. **Brazilian Oral Research**. São Paulo: USP, 2010. v. 24. p. 19 – 19. Ref. HA010.
2. BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., TAKAMUNE, S. S., BERNARDES, L. A. S., PRADO, E. F. G. B., CORDAS, T. A., NOBREGA, F. G., KOGA-ITO, C. Y. Eating disorders (anorexia nervosa and bulimia nervosa) and imbalance in oral bacterial microflora In: European Association of Oral Medicine 10th biennial conference 2010 London, 2010, Londres. **Oral Diseases**. , 2010. v. 16. p. 530 – 531. Ref. B64.
3. MATSUI, QYP., MOTA, A. J., BACK-BRITO, G. N., PEREIRA, DB., da SILVEIRA, NJF, Mittmann, J. Sexagem e seqüenciamento parcial do gene CHD-1/Z de *Mimus saturninus* taxidermizado In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá. **Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2010. p. 83 – 83. Ref. GA083
4. MOTA, A. J., BACK-BRITO, G. N., NOBREGA, F. G. A practical and rapid microplate method for yeast genomic DNA extraction In: 4Th Trends in Medical Mycology, 2009, Atenas. **Mycoses**. Berlin: Blackwell, 2009. v. 52. p. 94 – 94. Ref. P216.

5. MATOS, B. M., RIBEIRO, Z. E. A., KOMIYAMA, E. Y., BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., MARCHINI, L., FIGUEIREDO, M. S., BRAGA, J. A., KOGA-ITO, C. Y. Alterações na microbiota bucal de pacientes pediátricos com anemia falciforme sob terapia antibiótica profilática In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. **Microbiologia In Foco**. Navegantes: Dolika Afa Artes Gráfica, 2009. Ref. 1285-1.
6. BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., TAKAMUNE, S. S., BERNARDES, L. A. S., PRADO, E. F. G. B., NOBREGA, F. G., KOGA-ITO, C. Y. Diversidade bacteriana na cavidade bucal de pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa In: 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia, 2009, Águas de Lindóia. **Brazilian Oral Research**. São Paulo: USP, 2009. v. 23. p. 33 – 33. Ref. FC007.
7. BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., TAKAMUNE, S. S., BERNARDES, L. A. S., BALDUCCI, I., PRADO, E. F. G. B., CORDAS, T. A., NOBREGA, F. G., KOGA-ITO, C. Y. Diversidade bacteriana na cavidade bucal de pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. **Microbiologia In Foco**. Navegantes: Dolika Afa Artes Gráfica, 2009. v. 2. p. 98 – 98. Ref. 1506-1
8. BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., TAKAMUNE, S. S., BERNARDES, L. A. S., BALDUCCI, I., PRADO, E. F. G. B., CORDAS, T. A., NOBREGA, F. G., KOGA-ITO, C. Y. Evaluation of oral fungus diversity from patients with Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa by culture and molecular methods In: 4th Trends in Medical Mycology, 2009, 2009, Grecia. **Mycoses**. Berlin: Blackwell, 2009. v. 52, p. 57 – 57. Ref. P084.
9. KOGA-ITO, C. Y., FIGUEIREDO, M. S., BRAGA, J. A., BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., MATOS, B. M. Fungal microbiota in sickle cell anemia patients under antibiotic prophylaxis In: Trends in Medical Mycology, 2009, Atenas. **Mycoses**. Berlin: Blackwell, 2009. v. 52. p. 60 – 60. Ref. P092
10. GIUDICE, M. C., MENEZES, A. A. R., MOTA, A. J., GAMBALE, V. Avaliação quantitativa das atividades queratinolítica e elastinolítica e caracterização molecular de isolados de *Microsporum gypseum* de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil In: 5 Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife. **V Congresso Brasileiro de Micologia**. Ed. Universitária UFPE, 2007.
11. KOGA-ITO, C. Y., BACK-BRITO, G. N., MOTA, A. J., NAVAS, E.A.F.F., JORGE, A. O. C., NOBREGA, F. G. C. dubliniensis in Brazilian patients with type I and II diabetes mellitus, leprosy and under chemotherapy for breast cancer In: 3rd Trends in Medical Mycology, 2007, Turin. **Journal of Chemotherapy**. Firenze: E.S.I.F. srl, 2007. v. 19. p. 58 – 58. Ref. 083.
12. KOGA-ITO, C. Y., VASCONCELLOS, T. C., QUERIDO, S. M. R., JORGE, A. O. C., MOTA, A. J., NOBREGA, F. G., BACK-BRITO, G. N. Prevalence of *Candida* spp including *C. dubliniensis* among oral isolates from Brazilian HIV positive patients and correlation with CD4 cell counts and viral load In: 3rd Trends in Medical Mycology, 2007, Turin. **Journal of Chemotherapy**. Firenze: E.S.I.F.T. srl, 2007. v. 19. p. 59 – 59. Ref. 086.
13. BACK-BRITO, G. N., QUERIDO, S. M. R., MOTA, A. J., JORGE, A. O. C., NOBREGA, F. G., KOGA-ITO, C. Y. Presença de *C. dubliniensis* dentre os isolados bucais provenientes de pacientes HIV positivos e indivíduos controle In: 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e 2ª Reunião da Federação Latinoamericana/IADR, 2007, Atibaia. **Brazilian Oral Research**. São Paulo: USP, 2007. v. 21. p. 180 – 180. Ref. Pa152
14. Ribeiro PM, KOGA-ITO, C. Y., ALVES JS, BACK-BRITO, G. N., NOBREGA, F. G., MOTA, A. J., JORGE, A. O. C. identificação fenotípica e genotípica de *C. dubliniensis* em pacientes imunossuprimidos e pacientes saudáveis In: 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e 2ª Reunião da Federação Latinoamericana/IADR, 2007, Atibaia. **Brazilian Oral Research**. São Paulo: USP, 2007. v. 21. p. 302 – 302. Ref. Pc152.

ANEXO V

Artigo submetido

Mota, A.J., Nobrega, F.G. (2012). Unequivocal identification of fungi, especially *Candida* and related species. Under Review. J. Microbiol Methods. Manuscript Number: MIMET-D-12-00142.

Artigo em fase de correção

Mota, A.J., Back-Brito, G.N., Matos, B.M., Bernardes, L.A.S., Nobrega, F.G. (2012). *Candida rugosa* group: characterization of two new species using phenotypic and genotypic methods.

Elsevier Editorial System™ for Journal of Microbiological Methods Manuscript Draft

Manuscript Number: MIMEDT-D-12-00142

Title: Unequivocal identification of fungi, especially *Candida* and related species.

Article Type: Research Paper

Keywords: Fungi identification; *Candida* spp; Molecular methods; Ribotyping method.

Corresponding Author: MD PhD Francisco Gorgonio Nobrega, Ph.D

Corresponding Author's Institution: São Paulo State University

First Author: Adolfo J Mota

Order of Author's: Adolfo J Mota, Francisco G Nobrega

Abstract: Several methodologies have being developed for fungal identification. Nevertheless morphological and metabolic similarity makes correct differentiation difficult. In this paper, we present a Pattern Identification Guide suitable for the identification of 33 species of fungi, specially those most often isolated from human host in health and disease. The methodology allows discrimination that parallels rDNA sequencing analysis.

Pattern Identification Guide

This guide is useful in interpreting results after agarose gel electrophoresis. Each Table corresponds to only one species, here we have 33 Tables. There are 3 columns in the Tables; the first numbers are the restriction sites for that species, in order, from left to right over the DNA sequence. The second column shows nucleotide positions (in parenthesis) that define the DNA fragment generated by complete digestion. The number next to it indicates the expected size of this fragment. The last column has no correspondence to the other two: here we arranged the fragments by size, starting with the largest. This column is a useful guide to the pattern in the agarose gel. This prediction must match with the image obtained from the agarose gel, and we have confirmed that correspondence for the 33 patterns established in this work.

Use this guide as follows:

- 1 – Find the table corresponding to the species you suspect or look the third column in the tables that match the agarose gel pattern you got.
- 2 – The correspondence between the gel and the third column will confirm expected species.
- 3 - A pattern that does not fit one of the 33 presented here should be well characterized by sequencing and presented as a new possibility of identification.

Troubleshooting

Make sure that the PCR amplification is of good quality. Avoid inhibitors in the template solution, old enzyme, operate a reliable thermal cycler. Such problems may generate unspecific amplification, falsifying the *Ddel* digestion pattern. These problems compromise the identification, because the unspecific amplification usually generates short amplicons, no longer than 150 bp. However, these problems can be solved by purifying the template, changing reagents or adjusting cycling parameters. Second, partial digestion leaves an atypical pattern on the gel as shown in Tables such as Fig. S3 T8 and T10; Fig. S6 T21 and T22 that can be detected to avoid compromising the correct identification. Adding more enzyme or extending the incubation time, generally solve this artifact. And finally, overloading the gel with digestion products generates some distortion in the migration pattern of the fragments, as shown in Fig. S6 21 and 22. In our experience these displacements are usually within 50 bp from the expected position. Reducing the amount applied to half or one quarter should correct this artifact.

Table 1. *Candida albicans*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 877
2	(31 – 363) 333	Fragment 2 – 524
3	(364 – 1240) 877	Fragment 3 – 360
4	(1241 – 1336) 96	Fragment 4 – 333
5	(1337 – 1398) 62	Fragment 5 – 224
6	(1399 – 1622) 224	Fragment 6 – 212
7	(1623 – 2146) 524	Fragment 7 – 140
8	(2147 – 2286) 140	Fragment 8 – 096
9	(2287 – 2498) 212	Fragment 9 – 062
	(2499 – 2858) 360	Fragment 10 – 30

Table 2. *Candida dubliniensis*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 875
2	(31 – 363) 333	Fragment 2 – 526
3	(364 – 1238) 875	Fragment 3 – 360
4	(1239 – 1334) 96	Fragment 4 – 333
5	(1335 – 1396) 62	Fragment 5 – 223
6	(1397 – 1619) 223	Fragment 6 – 212
7	(1620 – 2145) 526	Fragment 7 – 120
8	(2146 – 2168) 23	Fragment 8 – 96
9	(2169 – 2288) 120	Fragment 9 – 62
10	(2289 – 2500) 212	Fragment 10 – 30
	(2500 – 2860) 360	Fragment 11 – 23

Table 3. *Candida tropicalis*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 875
2	(31 – 363) 333	Fragment 2 – 515
3	(364 – 1238) 875	Fragment 3 – 333
4	(1239 – 1334) 96	Fragment 4 – 290
5	(1335 – 1396) 62	Fragment 5 – 224
6	(1397 – 1620) 224	Fragment 6 – 212
7	(1621 – 2135) 515	Fragment 7 – 137
8	(2136 – 2272) 137	Fragment 8 – 96
9	(2273 – 2484) 212	Fragment 9 – 69
10	(2485 – 2774) 290	Fragment 10 – 62
	(2775 – 2843) 69	Fragment 11 – 30

Figure S1. PCR-RFLP patterns on an Ethidium bromide stained 2% agarose gel. Electrophoresis was at 100 volts for 90 minutes. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™); T1, *C. albicans*; T2, *C. dubliniensis*; T3, *C. tropicalis*. Arrows highlight the difference between *C. albicans* and *C. dubliniensis*

Table 4. *Debariomices hansenii*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 –30) 30	Fragment 1 – 889
2	(31 - 366) 336	Fragment 2 – 529
3	(367 – 1255) 889	Fragment 3 – 336
4	(1256 – 1351) 96	Fragment 4 – 237
5	(1352 – 1413) 62	Fragment 5 – 230
6	(1414 – 1637) 224	Fragment 6 – 224
7	(1638 – 2166) 529	Fragment 7 – 211
8	(2167 – 2403) 237	Fragment 8 – 131
9	(2404 – 2614) 211	Fragment 9 – 96
10	(2615 – 2844) 230	Fragment 10 – 62
	(2831 – 2975) 131	Fragment 11 – 31

Table 5. *Pichia anomala*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 881
2	(31 – 207) 177	Fragment 2 – 519
3	(208 -369) 162	Fragment 3 – 363
4	(370 – 1250) 881	Fragment 4 – 224
5	(1251 – 1346) 96	Fragment 5 – 211
6	(1347 – 1408) 62	Fragment 6 – 204
7	(1409 – 1632) 224	Fragment 7 – 177
8	(1633 – 1654) 22	Fragment 8 – 162
9	(1655 – 2173) 519	Fragment 9 – 96
10	(2174 – 2377) 204	Fragment 10 – 62
11	(2378 – 2588) 211	Fragment 11 – 30
	(2589 – 2951) 363	Fragment 12 – 22

Table 6. *Pichia norvegensis*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 964
2	(31 -360) 330	Fragment 2 – 483
3	(361 – 1324) 964	Fragment 3 - 349
4	(1325 – 1386) 62	Fragment 4 – 330
5	(1387 – 1612) 225	Fragment 5 – 225
6	(1613 – 2095) 483	Fragment 6 – 99
7	(2096 – 2148) 52	Fragment 7 – 85
8	(2149 – 2233) 85	Fragment 8 – 80
9	(2234 – 2262) 28	Fragment 9 - 62
10	(2263 – 2361) 99	Fragment 10 – 52
11	(2362 – 2441) 80	Fragment 11 – 30
12	(2442 – 2463) 22	Fragment 12 – 28
	(2464 – 2812) 349	Fragment 13 – 22

Figure S2. PCR-RFLP patterns on an Ethidium bromide stained 2% agarose gel. Electrophoresis was at 100 volts for 90 minutes. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™); T4, *D. hansenii*; T5, *P. anomala*; T6, *P. norvegensis*.

Table 7. *Candida parapsilosis*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 877
2	(31 – 362) 332	Fragment 2 – 648
3	(363 – 1239) 877	Fragment 3 – 332
4	(1240 – 1335) 96	Fragment 4 – 284
5	(1336 – 1397) 62	Fragment 5 – 224
6	(1398 – 1621) 224	Fragment 6 – 212
7	(1622 – 2269) 648	Fragment 7 – 96
8	(2270 – 2481) 212	Fragment 8 – 70
9	(2482 – 2765) 284	Fragment 9 – 62
10	(2766 – 2771) 6	Fragment 10 – 30
	(2772 – 2841) 70	Fragment 11 – 6

Table 8. *Pichia subpelliculosa*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 883
2	(31 – 367) 337	Fragment 2 – 739
3	(368 – 1250) 883	Fragment 3 – 361
4	(1251 – 1346) 96	Fragment 4 – 337
5	(1347 – 1408) 62	Fragment 5 – 224
6	(1409 – 1632) 224	Fragment 6 – 211
7	(1633 – 1654) 22	Fragment 7 – 96
8	(1655 – 2393) 739	Fragment 8 – 62
9	(2394 – 2604) 211	Fragment 9 – 30
	(2605 – 2965) 361	Fragment 10 – 22

Table 9. *Endomelanconiopsis endophytica*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 892
2	(31 – 363) 333	Fragment 2 – 722
3	(364 – 1255) 892	Fragment 3 – 333
4	(1256 – 1350) 95	Fragment 4 – 225
5	(1351 – 1411) 61	Fragment 5 – 211
6	(1412 – 1636) 225	Fragment 6 – 134
7	(1637 – 1658) 22	Fragment 7 – 102
8	(1659 – 2346) 688	Fragment 8 – 95
9	(2347 – 2448) 102	Fragment 9 – 67
10	(2449 – 2506) 58	Fragment 10 – 61
11	(2507 – 2717) 211	Fragment 11 – 58
12	(2718 – 2851) 134	Fragment 12 – 30
	(2852 – 2918) 67	Fragment 13 – 22

Table 10. *Candida krusei*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 957
2	(31 – 358) 328	Fragment 2 – 639
3	(359 – 1315) 957	Fragment 3 – 339
4	(1316 – 1377) 62	Fragment 4 – 328
5	(178 – 1600) 223	Fragment 5 – 223
6	(1601 – 2239) 639	Fragment 6 – 197
7	(2240 – 2268) 29	Fragment 7 – 62
8	(2269 – 2465) 197	Fragment 8 – 30
	(2466 – 2804) 339	Fragment 9 – 29

Figure S3. PCR-RFLP patterns on an Ethidium bromide stained 2% agarose gel. Electrophoresis was at 100 volts for 90 minutes. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™); T7, *C. parapsilosis*; T8, *P. subpelliculosa*; T9, *E. endophytica*; T10, *C. krusei*.

Table 11. *Paraccoccidioides brasiliensis*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 891
2	(31 – 363) 333	Fragment 2 – 333
3	(364 – 1254) 891	Fragment 3 – 294
4	(1255 – 1349) 95	Fragment 4 – 290
5	(1350 – 1410) 61	Fragment 5 – 270
6	(1411 – 1635) 225	Fragment 6 – 225
7	(1636 – 1657) 22	Fragment 7 – 202
8	(1658 – 1947) 290	Fragment 8 – 171
9	(1948 – 2241) 294	Fragment 9 – 102
10	(2242 – 2412) 171	Fragment 10 – 95
11	(2413 – 2514) 102	Fragment 11 – 61
12	(2515 – 2784) 270	Fragment 12 – 30
	(2785 – 2986) 202	Fragment 13 – 22

Table 12. *Candida inconspicua*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 310	Fragment 1 – 957
2	(31 – 360) 330	Fragment 2 – 378
3	(361 – 1317) 957	Fragment 3 – 352
4	(1318 – 1379) 62	Fragment 4 – 330
5	(1380 – 1602) 223	Fragment 5 – 223
6	(1603 – 1807) 205	Fragment 6 – 205
7	(1808 – 2185) 378	Fragment 7 – 97
8	(2186 – 2214) 29	Fragment 8 – 82
9	(2215 – 2311) 97	Fragment 9 – 62
10	(2312 – 2393) 82	Fragment 10 – 30
11	(2394 – 2415) 22	Fragment 11 – 29
	(2416 – 2767) 352	Fragment 12 – 22

Table 13. *Candida zeylanoides*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 888
2	(31 – 365) 335	Fragment 2 – 360
3	(366 – 1253) 888	Fragment 3 – 335
4	(1254 – 1349) 96	Fragment 4 – 301
5	(1350 – 1411) 62	Fragment 5 – 224
6	(1412 – 1635) 224	Fragment 6 – 223
7	(1636 – 1858) 223	Fragment 7 – 220
8	(1859 – 2159) 301	Fragment 8 – 211
9	(2160 – 2169) 10	Fragment 9 – 96
10	(2170 – 2389) 220	Fragment 10 – 62
11	(2390 – 2600) 211	Fragment 11 – 30
	(2601 – 2960) 360	Fragment 12 – 10

Table 14. *Candida palmioleophila*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1-30) 30	Fragment 1 – 901
2	(31- 365) 335	Fragment 2 – 335
3	(366-1266) 901	Fragment 3 – 297
4	(1267-1362) 96	Fragment 4 – 289
5	(1363-1424) 62	Fragment 5 – 230
6	(1425-1649) 225	Fragment 6 – 225
7	(1650-1879) 230	Fragment 7 – 211
8	(1880-2176) 297	Fragment 8 – 190
9	(2177-2223) 47	Fragment 9 – 96
10	(2224-2413) 190	Fragment 10 – 68
11	(2414-2624) 211	Fragment 11 – 62
12	(2625-2913) 289	Fragment 12 – 47
	(2914-2981) 68	Fragment 13 – 30

Figure S4. PCR-RFLP patterns on an Ethidium bromide stained 2% agarose gel. Electrophoresis was at 100 volts for 90 minutes. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™); T11, *P. brasiliensis*; T12, *C. inconspicua*; T13, *C. zeylanoides*; T14, *C. palmioleophila*.

Table 15. *Candida kefyr*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 890
2	(31 – 364) 334	Fragment 2 – 609
3	(365 – 1254) 890	Fragment 3 – 334
4	(1255 – 1348) 94	Fragment 4 – 266
5	(1349 – 1410) 62	Fragment 5 – 223
6	(1411 – 1633) 223	Fragment 6 – 211
7	(1634 – 1644) 11	Fragment 7 – 194
8	(1645 – 1655) 11	Fragment 8 – 94
9	(1655 – 1678) 23	Fragment 9 – 69
10	(1679 – 2287) 609	Fragment 10 – 62
11	(2288 – 2481) 194	Fragment 11 – 30
12	(2482 – 2692) 211	Fragment 12 – 23
13	(2693 – 2958) 266	Fragment 13 – 11
	(2959 – 3027) 69	Fragment 14 – 11

Table 16. *Microsporium gypseum*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 891
2	(31 – 363) 333	Fragment 2 – 562
3	(364 – 1254) 891	Fragment 3 – 333
4	(1255 – 1349) 95	Fragment 4 – 294
5	(1350 – 1410) 61	Fragment 5 – 285
6	(1411 – 1635) 225	Fragment 6 – 225
7	(1636 – 1920) 285	Fragment 7 – 110
8	(1921 – 2482) 562	Fragment 8 – 95
9	(2483 – 2592) 110	Fragment 9 – 67
10	(2593 – 2886) 294	Fragment 10 – 61
	(2887 – 2953) 67	Fragment 11 – 30

Table 17. *Saccharomyces cerevisiae*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 890
2	(31 – 365) 335	Fragment 2 – 783
3	(366 – 1255) 890	Fragment 3 – 335
4	(1256 – 1350) 95	Fragment 4 – 293
5	(1351 – 1412) 62	Fragment 5 – 223
6	(1413 – 1635) 223	Fragment 6 – 211
7	(1636 – 1646) 11	Fragment 7 – 139
8	(1647 – 1657) 11	Fragment 8 – 95
9	(1658 – 1680) 23	Fragment 9 – 69
10	(1641 – 2463) 783	Fragment 10 – 62
11	(2464 – 2602) 139	Fragment 11 – 30
12	(2603 – 2813) 211	Fragment 12 – 23
13	(2814 – 3106) 293	Fragment 13 – 11
	(3107 – 3175) 69	Fragment 14 – 11

Table 18. *Candida glabrata*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 890
2	(31 – 365) 335	Fragment 2 – 806
3	(366 – 1255) 890	Fragment 3 – 371
4	(1256 – 1350) 95	Fragment 4 – 335
5	(1351 – 1412) 62	Fragment 5 – 222
6	(1413 – 1635) 222	Fragment 6 – 211
7	(1636 – 1646) 11	Fragment 7 – 135
8	(1647 – 1657) 11	Fragment 8 – 95
9	(1658 – 1792) 135	Fragment 9 – 62
10	(1793 – 1836) 44	Fragment 10 – 44
11	(1837 – 2642) 805	Fragment 11 – 30
12	(2643 – 2853) 211	Fragment 12 – 11
	(2854 – 3224) 371	Fragment 13 – 11

Figure S5. PCR-RFLP patterns on an Ethidium bromide stained 2% agarose gel. Electrophoresis was at 100 volts for 90 minutes. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™); T15, *M. gypseum*; T16, *C. kefyr*; T17, *S. cerevisiae*; T18, *C. glabrata*.

Table 19. *Pichia guilliermondii*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 516
2	(31 – 365) 335	Fragment 2 – 500
3	(366 – 881) 516	Fragment 3 – 374
4	(882 – 1255) 374	Fragment 4 – 361
5	(1256 – 1351) 96	Fragment 4 – 335
6	(1352 – 1413) 62	Fragment 5 – 235
7	(1414 – 1637) 224	Fragment 6 – 224
8	(1638 – 2137) 499	Fragment 7 – 211
9	(2138 – 2372) 235	Fragment 8 – 096
10	(2373 – 2583) 211	Fragment 9 – 062
	(2584 – 2944) 361	Fragment 10 – 30

Table 20. *Geotrichum. capitatum*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 579
2	(31 – 294) 264	Fragment 2 – 452
3	(295 – 746) 452	Fragment 3 – 372
4	(747 – 1108) 362	Fragment 4 – 362
5	(1109 – 1258) 150	Fragment 5 – 264
6	(1259 – 1477) 219	Fragment 6 – 219
7	(1478 – 2056) 579	Fragment 7 – 150
8	(2057 – 2428) 372	Fragment 8 – 36
	(2428 – 2464) 36	Fragment 9 – 30

Table 21. *Candida lipolytica*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 15) 15	Fragment 1 – 706
2	(16 – 30) 15	Fragment 2 – 577
3	(31 – 322) 292	Fragment 3 – 506
4	(323 – 899) 577	Fragment 4 – 292
5	(900 – 1139) 240	Fragment 5 – 240
6	(1140 – 1234) 95	Fragment 6 – 95
7	(1235 – 1296) 62	Fragment 7 – 62
8	(1297 – 2002) 706	Fragment 8 – 15
	(2003 – 2508) 506	Fragment 9 – 15

Table 22. *Candida intermedia*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 869
2	(31 – 354) 324	Fragment 2 – 515
3	(355 – 1223) 869	Fragment 3 – 415
4	(1224 – 1317) 94	Fragment 4 – 324
5	(1318 – 1379) 62	Fragment 5 – 222
6	(1380 – 1601) 222	Fragment 6 – 116
7	(1602 – 2116) 515	Fragment 7 – 94
8	(2117 – 2232) 116	Fragment 8 – 62
	(2233 – 2647) 415	Fragment 9 – 30

Figure S6. PCR-RFLP patterns on an Ethidium bromide stained 2% agarose gel. Electrophoresis was at 100 volts for 90 minutes. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™); T19, *P. guilliermondii*; T20, *G. capitatum*; T21, *C. lipolytica*; T22, *C. intermedia*.

Table 23. *Candida pararugosa*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 1212) 1212	Fragment 1 – 1212
2	(1213 -1368) 156	Fragment 2 – 543
3	(1369 – 1592) 224	Fragment 3 – 368
4	(1593 – 2135) 543	Fragment 4 – 224
5	(2136 – 2311) 176	Fragment 5 – 176
6	(2312 – 2679) 368	Fragment 6 - 156

Table 24. *Candida* sp. L96D

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 657
2	(31 - 344) 314	Fragment 2 – 368
3	(345 – 1001) 657	Fragment 3 – 314
4	(1002 – 1206) 205	Fragment 4 – 224
5	(1207 – 1300) 94	Fragment 5 – 222
6	(1301 – 1362) 62	Fragment 6 – 205
7	(1363 – 1584) 222	Fragment 7 – 197
8	(1585 – 1740) 156	Fragment 8 – 156
9	(1741 – 2108) 368	Fragment 9 - 94
10	(2109 – 2305) 197	Fragment 10 – 64
11	(2306 – 2529) 224	Fragment 11 – 62
	(2530 – 2593) 64	Fragment 12 – 30

Table 25. *Candida* sp. SK75

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 486
2	(31 - 350) 320	Fragment 2 – 392
3	(351 – 612) 262	Fragment 3 – 384
4	(613 – 1004) 392	Fragment 4 – 320
5	(1005 – 1210) 206	Fragment 5 – 262
6	(1211 – 1304) 94	Fragment 6 – 222
7	(1305 – 1366) 62	Fragment 7 – 206
8	(1367 – 1588) 222	Fragment 8 – 143
9	(1589 – 1731) 143	Fragment 9 – 94
10	(1732 – 2115) 384	Fragment 10 – 62
	(2116 – 2601) 486	Fragment 11 – 30

Table 26. *Candida rugosa*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 525
2	(31 – 344) 314	Fragment 2 – 421
3	(345 - 598) 254	Fragment 3 – 377
4	(599 – 624) 26	Fragment 4 – 314
5	(625 – 1001) 377	Fragment 5 – 254
6	(1002 – 1207) 206	Fragment 6 – 222
7	(1208 – 1301) 94	Fragment 7 – 206
8	(1302 – 1363) 62	Fragment 8 – 94
9	(1364 – 1585) 222	Fragment 9 – 64
10	(1586 – 2110) 525	Fragment 10 – 62
11	(2111 – 2531) 421	Fragment 11 – 30
	(2532 – 2595) 64	Fragment 12 – 26

Figure S7. PCR-RFLP patterns on an Ethidium bromide stained 2% agarose gel. Electrophoresis was at 100 volts for 90 minutes. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™); T23, *P. pararugosa*; T24, *Candida* sp. L96D; *Candida* sp. SK75; T26, *C. rugosa*.

Table 27. *Trichosporon mucoides*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 656
2	(31 - 364) 334	Fragment 2 – 517
3	(365 – 881) 517	Fragment 3 – 396
4	(882 – 1254) 373	Fragment 4 – 373
5	(1255 – 1349) 95	Fragment 5 – 334
6	(1350 – 1411) 62	Fragment 6 – 137
7	(1412 – 1446) 35	Fragment 7 – 104
8	(1447 – 1472) 26	Fragment 8 – 95
9	(1473 – 1499) 27	Fragment 9 – 62
10	(1500 – 1636) 137	Fragment 10 – 50
11	(1637 - 2292) 656	Fragment 11 – 47
12	(2293 – 2396) 104	Fragment 12 – 35
13	(2397 – 2792) 396	Fragment 13 – 30
14	(2793 - 2839) 47	Fragment 14 – 27
	(2840 - 2889) 50	Fragment 15 – 26

Table 28. *Candida lusitaniae*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 562
2	(31 -352) 322	Fragment 2 – 561
3	(353 – 619) 267	Fragment 3 – 325
4	(620 – 659) 40	Fragment 4 – 325
5	(660 – 1220) 561	Fragment 5 – 267
6	(1221 – 1314) 94	Fragment 6 – 222
7	(1315 – 1376) 62	Fragment 7 – 123
8	(1377 – 1598) 222	Fragment 8 – 94
9	(1599 – 1621) 23	Fragment 9 – 62
10	(1622 – 2183) 562	Fragment 10 – 30
11	(2184 – 2306) 123	Fragment 11 - 40
	(2307 – 2631) 325	Fragment 12 - 23

Table 29. *Candida stellata*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 621
2	(31 - 342) 312	Fragment 2 – 590
3	(343 – 932) 590	Fragment 3 – 312
4	(933 – 1212) 280	Fragment 4 – 280
5	(1213 – 1366) 154	Fragment 5 – 222
6	(1367 – 1588) 222	Fragment 6 – 221
7	(1589 – 2209) 621	Fragment 7 – 154
8	(2210 – 2270) 61	Fragment 8 – 123
9	(2271 – 2393) 123	Fragment 9 – 61
10	(2394 – 2614) 221	Fragment 10 - 48
	(2315 – 2662) 48	Fragment 11 - 30

Figure S8. PCR-RFLP patterns on an Ethidium bromide stained 2% agarose gel. Electrophoresis was at 100 volts for 90 minutes. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™); T27, *T. mucoides*; T28, *C. lusitaniae*; T29, *C. stellata*;

Table 30. *Ogathaea thermofila*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 885
2	(31 – 363) 333	Fragment 2 – 498
3	(364 – 1248) 885	Fragment 3 – 399
4	(1249 – 1342) 94	Fragment 4 – 333
5	(1343 – 1404) 62	Fragment 5 – 227
6	(1405 – 1628) 224	Fragment 6 – 224
7	(1629 – 1775) 147	Fragment 7 – 147
8	(1776 – 1871) 96	Fragment 8 – 96
9	(1872 – 2270) 399	Fragment 9 – 95
10	(2271 – 2497) 227	Fragment 10 – 69
11	(2498 – 2995) 498	Fragment 11 – 62
	(2996 – 3064) 69	Fragment 12 – 30

Table 31. *Trichosporon inkin*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 1167
2	(31 – 364) 334	Fragment 2 – 373
3	(365 – 653) 289	Fragment 3 – 334
4	(654 – 881) 228	Fragment 4 – 289
5	(882 – 1254) 373	Fragment 5 – 228
6	(1255 – 1349) 95	Fragment 6 – 137
7	(1350 – 1411) 62	Fragment 7 – 95
8	(1412 – 1446) 35	Fragment 8 – 62
9	(1447 – 1472) 26	Fragment 9 – 50
10	(1473 – 1499) 27	Fragment 10 – 48
11	(1500 – 1636) 137	Fragment 11 – 35
12	(1637 – 2803) 1167	Fragment 12 – 30
13	(2804 – 2851) 48	Fragment 13 – 27
	(2852 – 2901) 50	Fragment 14 – 26

Table 32. *Trichosporon asahii*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 30) 30	Fragment 1 – 1170
2	(31 – 364) 334	Fragment 2 – 373
3	(365 – 653) 289	Fragment 3 – 334
4	(654 – 690) 37	Fragment 4 – 289
5	(691 – 881) 191	Fragment 5 – 191
6	(882 – 1254) 373	Fragment 6 – 137
7	(1255 – 1349) 95	Fragment 7 – 95
8	(1350 – 1411) 62	Fragment 8 – 62
9	(1412 – 1446) 35	Fragment 9 – 50
10	(1447 – 1472) 26	Fragment 10 – 48
11	(1473 – 1499) 27	Fragment 11 – 37
12	(1500 – 1636) 137	Fragment 12 – 35
13	(1637 – 2806) 1170	Fragment 13 – 30
14	(2807 – 2854) 48	Fragment 14 – 27
	(2855 – 2904) 50	Fragment 15 – 26

Table 33. *Exophiala dermatitides*

Site no.	Nucleotide positions and fragment size	Fragment size arrangement
1	(1 – 350) 350	Fragment 1 – 1679
2	(361 – 2039) 1679	Fragment 2 – 575
3	(2040 – 2069) 30	Fragment 3 – 350
4	(2070 – 2225) 156	Fragment 4 – 301
5	(2226 – 2320) 95	Fragment 5 – 225
6	(2321 – 2381) 61	Fragment 6 – 173
7	(2382 – 2606) 225	Fragment 7 – 159
8	(2607 – 2628) 22	Fragment 8 – 156
9	(2629 – 2651) 23	Fragment 9 – 107
10	(2652 – 2758) 107	Fragment 10 – 95
11	(2759 – 2917) 159	Fragment 11 – 61
12	(2918 – 3218) 301	Fragment 12 – 30
13	(3219 – 3391) 173	Fragment 13 – 23
	(3392 – 3966) 575	Fragment 14 – 21

Figure S9. PCR-RFLP patterns on an Ethidium bromide stained 2% agarose gel. Electrophoresis was at 100 volts for 90 minutes. L, 100 bp DNA Ladder 15628-019 (Invitrogen™); T30, *O. thermofila*; T31, *T. inkin*; T32, *T. asahii*; T33, *E. dermatitides*.

ANEXO VI

O protocolo final sugerido permite a extração a partir de diferentes espécies, e pode ser facilmente adaptado para as necessidades das rotinas de cada laboratório sugerimos:

Fazer o inóculo em 150 μL do meio YPD 0,001% v/v Tween 20 e incubar pela noite. Centrifugar as placas (2500 g , 20°C) por 5 min e descartar o sobrenadante por inversão.

Dispersar as células em 100 μL do tampão de lise (100 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 25 mM DTT, 1 M sorbitol, Zymolyase® 165 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubar a 37°C por 30 min, após esse período, Adicionar SDS para concentração final de 1% seguido de incubação a 65°C por 30 min.

Tratar os lisados com 2,5 M (v/v de 5 M acetato de potássio). Deixar as placas à - 20°C por 1h e em seguida, centrifugar (2250 g , 4°C) por 25 min.

Transferir 150 μL do sobrenadante para placas previamente preparadas igual volume de isopropanol e mantê-las em gelo por 15 min. Centrifugar (2250 g) por 15 min, descartar o sobrenadante e lavar o precipitado uma vez com etanol 80% (centrifugação a 4°C e 2250 g por 5 min). Deixar o precipitado final secar em temperatura ambiente e redissolver em 30 μL do tampão TE-RNase (10 mM TE, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ RNase, pH 7,5). Aplicar 2 μL do produto de extração em gel 1%gel de agarose para análise da extração.

ANEXO VI

Projeto paralelo desenvolvido durante o doutorado

(Aprovado pelo CEP IBUSP 113/210 – FR. 387425)

Glucoquinase e MODY 2: Busca por mutações no gene GCK em uma família com hipótese diagnóstica de diabetes mellitus não-insulino-dependentes.

Atualmente, já se sabe que além dos quadros clássicos do diabetes mellitus (DM), existe uma grande variedade de manifestações clínicas que levam a uma alteração na homeostase da glicemia no organismo. Essas variedades foram classificadas como MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) e estão relacionadas ao início precoce do diabetes tipo 2 que pode se desenvolver em crianças, adolescentes ou adultos jovens.

O MODY é definido como uma forma familiar de início precoce do diabetes tipo 2 não dependente de insulina NIDDM (Non-Insulino-Dependent-Diabetes Mellitus) com alta penetrância e modo de transmissão autossômico dominante, causado por mutação heterozigota em diversos genes envolvidos no metabolismo da glicose, designados como genes MODY (Tinto et al, 2008). Até o momento existem 11 tipos de MODY descritos no OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man).

O quadro clínico para os diferentes tipos é semelhante, mas o prognóstico pode variar (Barrio et al, 2009). Vaxillaire e Froguel (2008) definem os principais critérios para o diagnóstico como sendo: 1 – hiperglicemia

normalmente observada antes dos 25 anos em pelo menos um e idealmente dois membros da família; 2 – padrão de herança autossômica dominante, com transmissão vertical por pelo menos três gerações e com o fenótipo similar entre os membros afetados da família; 3 – ausência de insulinoterapia por pelo menos cinco anos antes do diagnóstico; 4 – níveis normais de insulina. Os autores ainda observam que sobrepeso ou obesidade estão raramente associados ao MODY e não são relevantes no desenvolvimento dessa forma de diabetes.

Dentre os vários subtipos, MODY2 e 3 são os mais freqüentes e acometem aproximadamente 80% dos pacientes (Frayling et al, 2001). A epidemiologia de ambos pode variar bastante, o MODY2 é o mais freqüente na França e Itália, cerca de 60 % contra 21% para o MODY 3. Entretanto a situação se inverte na Inglaterra, Alemanha, Estados Unidos e Espanha, a exemplo, na Inglaterra, pacientes MODY 3 respondem por 73% dos casos contra 11% de MODY 2 (Massa et al, 2001). Outros aspectos interessantes da epidemiologia são a baixa prevalência em negros e alta em caucasianos e a estimativa de que 5% dos indivíduos diagnosticados como portadores de diabetes mellitus tipo 2 e 10% daqueles considerados como tipo 1 sejam na verdade “pacientes MODY” (Lederman, 1995).

No Brasil não existem muitos estudos a respeito, Moises, Reis e Morel (2001) em um estudo com 32 indivíduos de 12 famílias diferentes todas com casos de diabetes tipo 2, encontraram uma maior prevalência do MODY3, aproximadamente 42%. Furozawa et al (2008) avaliaram 84 indivíduos de 23 famílias com o fenótipo clássico de MODY e nesse estudo, o MODY3 também foi mais freqüente, 13% contra 8,7% para o MODY2.

O MODY2 é causado pela ineficiência ou ausência glucoquinase, primeira enzima da via glicolítica, responsável por fosforilar a glicose transformando-a em glicose-6-fosfato. O gene da glucoquinase (GCK) está situado no cromossomo 7 e é composto por 10 exons, até o momento, já foram identificadas mais de 600 mutações nesse gene (Vaxillaire e Froguel, 2008).

O MODY2 é o que tem melhor prognóstico, a hiperglicemia é de caráter leve e a doença não tem caráter progressivo. O tratamento se baseia em dieta, o uso de insulina não é indicado e hipoglicemiantes orais são ineficazes (Toaima et al, 2005).

Nesse trabalho investigamos a ocorrência do MODY2 em uma família com histórico de hiperglicemia leve, não progressiva, com característica de herança vertical e por três gerações consecutivas.

Dois probando tiveram todos os exons desse gene seqüenciados e identificamos uma mutação que introduz um códon prematuro de parada no exon 2 (c.76C>T). Com base nesse resultado, desenvolvemos um método alternativo ao seqüenciamento baseado na PCR-RFLP e avaliamos essa mutação específica em outros 121 probandos da família sendo que 20 apresentaram o mesmo traço genético e clínica relacionada.

Artigo em fase de correção e será submetido para revisão ao *American Journal of Medical Genetics*.

Mota, A.J., Brüggemann, S., Costa, F., Nobrega, F.G. (2012). MODY 2: new Mutations Identified in a Brazilian family.