VAGNER OLIVEIRA CARVALHO

**Identificação e análise de mutações no gene ERG11
de isolados de *Candida* susceptíveis e resistentes ao
fluconazol**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria.

Área de concentração: Pediatria

Orientadora: Dr^a. Gilda Maria Barbaro Del Negro

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira-Carvalho, Vagner

Identificação e análise de mutações no gene ERG11 de isolados de *Candida* susceptíveis e resistentes ao fluconazol / Vagner Oliveira Carvalho. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientadora: Gilda Maria Barbaro Del Negro.

Descritores: 1.ERG11 2.Resistência 3.Mutação 4.*Candida* 5.Fluconazol

USP/FM/DBD-496/10

Agradecimentos

Minha lista de agradecimentos não poderia começar com outra pessoa que não o meu irmão Dr. Vitor Oliveira Carvalho. Determinante, foi quem clareou meus olhos e primeiro incentivou a esta caminhada, facilitando-a de tantas maneiras a qual não conseguiria imaginar como teria sido sem a sua intervenção. Muito obrigado meu irmão e espelho!

Não poderia deixar de citar aqui, logo em seguida, meus pais e verdadeiros mestres: Carlos Alberto Lopes Carvalho e Maisete Jane Menezes de Oliveira. Apoiadores de primeira, não mediram esforços para que eu chegasse aqui. Longe de seus cuidados aprendi o real valor de seus ensinamentos e o quão são importantes na minha vida. Obrigado por todo o apoio e ensinamentos, certamente, me foram muito úteis! Também, gostaria de agradecer a minha irmã Vivane Oliveira Carvalho, que sempre acreditou mais em mim do que eu mesmo.

Dando continuidade na cronologia, gostaria de agradecer a uma pessoa muito especial: a Profa. Dra. Thelma Suely Okay. São tantos motivos para agradecê-la que certamente não caberiam neste papel e nem tampouco saberia por onde começar. Foi quem me recebeu de braços abertos e deu o primeiro pontapé nesta caminhada, me guiando com olhos de águia ao longo destes anos. Muito obrigado! Foi muito proveitoso estar ao lado de uma profissional de excelência como a senhora.

Palavras não há para agradecer a pessoa mais importante para o desenvolvimento desse estudo: Dra. Gilda Barbaro Del Negro, quem me

orientou com raro brilhantismo e sensibilidade que a diferenciam como educadora. Juntos compartilhamos alegrias e tristezas, conhecimentos e dúvidas, além de muitas outras antíteses. De coração, muito obrigado! Minha caminhada teria sido muito mais árdua sem os seus cuidados.

Agradeço também a Dra. Léa Campos de Oliveira e Lídia Yamamoto pelos ensinamentos com a prática laboratorial; à Maria Luisa Nunes, Dra. Lucia Braz e Dra. Patrícia Pieri pelo apoio; Ao Dr. Gil Benard (LIM-56) pelas correções do inglês; à Dra. Karen Brunialti (LIM-56) e Gina Camillo Rocha Silvestre (LIM-02) pelas contribuições para a realização dos sequenciamentos; Aos colegas de trabalho e amigos Roberta Lelis Dutra, Fernanda Macaferri, Erika Manuli, Mariana Vitule, Cleison Taira, Lília Spaleta, Clara Felix, Stephanie Baptista e Paulo Tadash pelos papos, alegria e apoio.

À seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, em especial a Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem, pelo fornecimento dos isolados de *Candida*.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

“O conhecimento só é pleno quando compartilhado”

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Mecanismos de resistência ao fluconazol	10
1.1.1 Super expressão de bombas de efluxo	10
1.1.2 Alteração na biossíntese do ergosterol	13
1.1.3 Mutações no gene ERG11	14
1.1.4 Super expressão do gene ERG11	17
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	19
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Isolados de <i>Candida</i> e cepas de referência	21
4.2 Teste de susceptibilidade ao fluconazol.....	22
4.3 Extração de DNA de <i>Candida</i> (isolados e cepas de referência)	23
4.4 Identificação molecular dos isolados de <i>Candida</i>	24
4.5 Protocolo para amplificação do gene ERG11	25
4.6 Eletroforese SSCP	26

4.7 Seqüenciamento automatizado dos amplificados	27
4.8 Controle dos processos de amplificação e dos riscos biológicos	29
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Identificação molecular dos 87 isolados de <i>Candida</i>	31
5.2 Delineamento dos <i>primers</i> e amplificação do gene ERG11 das cinco espécies de <i>Candida</i>	31
5.3 Análise dos amplificados do gene ERG11 das cinco espécies de <i>Candida</i> por eletroforese SSCP	36
5.4 Análise dos amplificados do gene ERG11 das cinco espécies de <i>Candida</i> por seqüenciamento automatizado	38
5.4.1 Mutações silenciosas	41
5.4.2 Mutações de sentido trocado	44
6 DISCUSSÃO.....	51
6.1 Identificação molecular dos isolados do estudo.....	52
6.2 Amplificações dos fragmentos do gene ERG11 com os <i>primers</i> delineados no estudo.....	53
6.3 Análise por eletroforese SSCP dos amplificados de ERG11.....	53
6.4 Mutações silenciosas.....	56
6.5 Mutações de sentido trocado.....	59
7 CONCLUSÕES.....	72
8 ANEXOS.....	73
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
APÊNDICES	

Lista de figuras

- Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose a 2%, mostrando ampliações dos fragmentos 2 (A) e 3 (B) do gene ERG11 de *C. albicans*.... 35
- Figura 2** – Gel de poliacrilamida a 6% mostrando diferentes padrões de mobilidade eletroforética (SSCP) do terceiro fragmento (ERGsec3) do gene ERG11, para alguns isolados de *C. albicans*..... 36
- Figura 3** – Gel de poliacrilamida a 6% mostrando padrões de migração diferenciados dos isolados 45170 e da cepa ATCC, após eletroforese SSCP do segundo fragmento de *C. tropicalis* (CtERGr2) 37
- Figura 4** – Gel de poliacrilamida a 6% mostrando os três padrões de mobilidade eletroforética obtidos por SSCP, do único fragmento amplificado do complexo *C. parapsilosis* (CpERG)..... 37
- Figura 5** – Número de mutações encontradas no gene ERG11 de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. tropicalis*, dispostas de acordo com o tipo de mutação..... 40

Lista de figuras

- Figura 6** – Mutação D116E identificada em homozigose (A) e em heterozigose (B), no gene ERG11 de *C. albicans* (isolados 06/05; ATCC 64550)..... 44
- Figura 7** – Mutações de sentido trocado identificadas no gene ERG11 de isolados de *C. albicans* do estudo..... 45
- Figura 8** – Mutações de sentido trocado identificadas no gene ERG11 de isolados de *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* do estudo..45
- Figura 9** – Géis de SSCP a 6% mostrando os amplificados do primeiro fragmento de *C. albicans* (A) e quarto fragmento de *C. tropicalis* (B) destacando as mutações de sentido trocado e silenciosas (entre colchetes) identificadas por seqüenciamento automatizado..... 55
- Figura 10** – Comparação entre a freqüência de mutações encontradas no gene ERG11 de *C. albicans* por Marichal *et al.*, 1999 (A) e número de ocorrências de mutações encontradas neste estudo (B)..... 60

Lista de figuras

Figura 11 – Visualização da predição da estrutura tridimensional da enzima ERG11p (14DM) de <i>C. albicans</i> (3d-jigsaw) utilizando o software Rasmol 2.7.5. Visão frontal (A) e lateral (B) da enzima, destacando em vermelho a localização da mutação L321F encontrada no estudo, e em verde a mutação T315A avaliada no estudo de Lamb <i>et al.</i> (1997).....	65
---	----

Lista de tabelas

Tabela 1 – Primers que amplificam o gene ERG11 de <i>C. albicans</i> (Xu <i>et al.</i> , 2008) e das demais espécies de <i>Candida</i> delineados no estudo	34
Tabela 2 – Nanogramas de DNA e concentração de sulfato de amônia [(NH ₄) ₂ SO ₄] utilizadas para as amplificações do gene ERG11 das cinco espécies de <i>Candida</i>	35
Tabela 3 – Número e tipo de mutação encontrada após seqüenciamento dos 109 fragmentos do gene ERG11, das cinco espécies de <i>Candida</i>	41
Tabela 4 – Polimorfismos encontrados na seqüência nucleotídica do gene ERG11 de <i>C. krusei</i> , disponíveis no GenBank e identificados nos isolados do estudo.....	42
Tabela 5 – Polimorfismos encontrados na seqüência nucleotídica do gene ERG11 de <i>C. glabrata</i> , disponíveis no GenBank e identificados nos isolados do estudo.....	43

Lista de tabelas

- Tabela 6** – Polimorfismos encontrados na sequência nucleotídica do gene ERG11 de *C. tropicalis*, disponíveis no GenBank e identificados nos isolados do estudo..... 43
- Tabela 7** – Sítio de isolamento, resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* ao fluconazol e mutações encontradas no gene ERG11 dos isolados clínicos de *Candida* e cepas ATCC..... 48
- Tabela 8** – Alinhamento múltiplo (ClustalW2) de sequências da enzima 14DM, de nove espécies de fungos, mostrando as mutações de sentido trocado identificadas no estudo. Os aminoácidos idênticos aos de *C. albicans* são representados por um ponto; aminoácidos altamente conservados estão em sombreado; ‘-’ é indicativo de uma lacuna no alinhamento; a posição do aminoácido foi numerada de acordo com a sequência de *Candida* na qual a mutação foi identificada..... 70

Lista de abreviaturas

etc. – *Et cetera*

spp. – espécies

pb – pares de bases

et al. – e outros

Lista de símbolos

1:1	proporções iguais
α	alfa
β	beta
Δ	delta
μg	microgramas
μl	microlitro
μM	micromolar
A	adenina
C	citosina
g	força gravitacional
G	guanina
kV	kilovolts
mA	miliampères
ml	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramas
nm	nanômetros
T	timina
u	unidade
v/v	volume sobre volume
V	volts
°C	grau Celsius
$\geq$	maior ou igual que

Lista de siglas

14DM	14 α -demetilase
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CDR	<i>Candida Drug Resistance</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossomal
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERG3	<i>Ergosterol biosynthesis gene 3</i>
ERG11	<i>Ergosterol biosynthesis gene 11</i>
ERG11p	14 α -demetilase
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLU1	<i>Fluconazole resistance gene</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer Regions</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica

Lista de siglas

M27-A3	Protocolo de microdiluição em caldo utilizado para teste de susceptibilidade a antifúngicos
MDR1	<i>Multidrug Resistance</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
P-450	Citocromos que absorvem o comprimento de onda de 450nm
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDR1	<i>Pleiotropic Drug Resistance</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSCP	<i>Single-Strand Conformational Polymorphism</i>
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultra-violeta

Identificação e análise de mutações no gene ERG11 de isolados de *Candida* suscetíveis e resistentes ao fluconazol

Por muitos anos o fluconazol tem sido uma opção usual para tratamento de infecções por *Candida*. Entretanto, o uso indiscriminado desta terapia antimicótica tem favorecido o surgimento de microrganismos resistentes. A redução da afinidade da enzima alvo dos antifúngicos, 14- α -demetilase (ERG11p), tem sido descrita como um importante mecanismo de resistência, caracterizado por mutações em seu gene codificante ERG11. Neste estudo, foi investigada a suscetibilidade ao fluconazol de 87 isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, com valores de MIC determinados através do método de microdiluição em caldo M27-A3 (CLSI, 2008); verificou-se que dezessete isolados apresentavam decréscimo da suscetibilidade ao fluconazol. A triagem de mutações foi realizada através da amplificação de quatro regiões do gene ERG11 com primers específicos delineados neste estudo, para cada espécie de *Candida*, seguida de análise pela técnica de eletroforese SSCP e seqüenciamento automatizado. Foram identificadas 217 mutações, incluindo 185 silenciosas e 32 por troca de sentido (que altera o aminoácido resultante). Estas últimas foram observadas em 19 isolados e 17 resíduos distintos, sendo 7 deles ainda não descritos anteriormente: L321F em *C. albicans*; K53M em *C. krusei*; Y221F, K344T, V362M e R371S em *C. tropicalis*; e R398I em *C. parapsilosis*. Confrontando os resultados entre a técnica de eletroforese SSCP e seqüenciamento automatizado, não houve associação direta entre as mudanças na migração eletroforética e alterações na seqüência nucleotídica do gene ERG11. Sugerimos que a frequência elevada de alterações no gene ERG11 de *Candida* deve ser considerada no design de novos fármacos que visem a enzima ERG11p.

Descritores:

ERG11; Resistência; Mutação; *Candida*; fluconazol

Identification and analyses of ERG11 gene mutations from fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida* isolates

For many years, fluconazole has been a usual option for treatment of *Candida* infections. However, the indiscriminate use of antimycotic therapy has favored the emergence of resistant organisms. The decrease in the affinity of the enzyme target of antifungal agents, 14- α -demethylase (ERG11p), has been described as an important mechanism of resistance, characterized by mutations in its encoding gene ERG11. In this study, we investigated the susceptibility to fluconazole of 87 strains of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. glabrata* with MIC values determined by broth microdilution M27-A3 (CLSI, 2008), found that seventeen isolates showed decreased susceptibility to fluconazole. Mutation screening was performed by the amplification of four regions of the ERG11 gene with specific primers designed in this study for each *Candida* species, followed by electrophoresis SSCP analysis and sequencing. We identified 217 mutations, including 185 silent mutations and 32 missense mutations. Missense mutations were observed in 19 isolates and 17 distinct residues, 7 of them still not described earlier: L321F in *C. albicans*, K53M in *C. krusei*; Y221F, K344T, V362M and R371S in *C. tropicalis*, and R398I in *C. parapsilosis*. Comparing the results between SSCP electrophoresis technique and sequencing, there was no direct association between changes in electrophoretic migration and changes in the nucleotide sequence of the ERG11 gene. We suggest that the high frequency of changes in ERG11 gene of *Candida* should be considered in the design of new drugs targeting the enzyme ERG11p.

Descriptors:

ERG11; Resistance; Mutations; *Candida*; Fluconazole

1. INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são microrganismos unicelulares e pleomórficos, incluem aproximadamente 150 espécies, das quais cerca de 20 foram descritas como agentes etiológicos de candidíases (Lacaz *et al.*, 2002; Sugita *et al.*, 2004). Estas leveduras têm distribuição ubíqua na natureza, podendo ser isoladas de folhas, água, solo etc. Considerando-se a flora normal do homem, são encontradas como saprófitas em dobras da pele, orofaringe, mucosa vaginal e colonizam o trato gastrointestinal em até 80% de indivíduos saudáveis (Lacaz *et al.*, 2002; Colombo e Guimarães, 2003; Barbedo e Sgarbi, 2010).

Ocorrendo alterações nos mecanismos de defesa ou comprometimento das barreiras anatômicas, essas leveduras podem tornar-se patogênicas, originando diversos tipos de infecções com amplo espectro de manifestações clínicas, desde formas cutâneo-mucosas benignas até formas invasivas, que comprometem diversos órgãos, após disseminação do agente por via hematogênica (Lacaz *et al.*, 2002; Colombo e Guimarães, 2003; Chapman e Faix, 2003).

Mais de 90% dos casos de infecções invasivas são causados por *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pfaller e Diekema, 2007; Warnock, 2007).

Em todas as partes do mundo, *Candida albicans* é a espécie mais freqüentemente isolada, tanto de infecções superficiais como invasivas, estando associada a taxas de mortalidade mais elevadas. Nas infecções

hematogênicas ou candidemias, a frequência de isolamento varia de 40% dos casos em países da América Latina, até 70% em alguns países nórdicos (Sandven, 2000; Colombo e Guimarães, 2003; Tortorano *et al.*, 2006; Pfaller e Diekema, 2007). Esta espécie é naturalmente sensível aos medicamentos antifúngicos de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida aos azólicos, particularmente ao fluconazol, têm sido descritos em pacientes que recebem terapia prolongada (White *et al.*, 1998; Pfaller e Diekema, 2007).

Candida glabrata ocupa o segundo lugar entre as espécies isoladas de infecções hematogênicas nos EUA, com frequência em torno de 20 a 25% dos casos, enquanto em países da América Latina somente de 4 a 7% são atribuídos a esta espécie (Sandven, 2000; Pfaller e Diekema, 2007; Perlroth *et al.*, 2007). Enquanto em países da Europa a frequência de isolamento desta espécie permaneceu praticamente inalterada ao longo dos últimos anos, nos EUA houve aumento, com elevada porcentagem de isolados resistentes ao fluconazol e com resistência cruzada a outros medicamentos da classe dos azóis, além de menor susceptibilidade à anfotericina B (Warnock, 2007; Pfaller e Diekema, 2007). Esta espécie está relacionada a taxas de mortalidade relativamente elevadas, podendo atingir 100% nos casos de transplante de medula óssea, que apresentam complicações do quadro infeccioso (Barbedo e Sgarbi, 2010).

Candida parapsilosis é uma levedura comumente encontrada em solo, água e plantas, e emerge como importante patógeno nosocomial; tem sido frequentemente isolada das mãos de profissionais de saúde e de soluções de nutrição parenteral (Pfaller e Diekema, 2007). É responsável por 7 a 15%

dos episódios de candidemia nos EUA, e em países da América Latina, ocupa o segundo lugar entre as espécies com maior frequência de isolamento (Antunes *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2006; Barbedo e Sgarbi, 2010). Em recém-nascidos pré-termo, internados em unidades de cuidados intensivos neonatais, a ocorrência da levedura é elevada, atingindo até 50% dos casos de candidemias (Levy *et al.*, 1998; Yamamura *et al.*, 2001; Chapman e Faix, 2003).

Diversos estudos de tipagem molecular de *C. parapsilosis*, baseados em análise de isoenzimas, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e cariotipagem, demonstraram diversidade nos padrões ou perfis analisados, sugerindo a divisão da espécie em três grupos: I, II e III (Scherer e Stevens, 1987; Lin *et al.*, 1995; Roy e Meyer, 1998). Tavanti e colaboradores em 2005, analisando as seqüências da região ITS do DNA ribossomal de diversos isolados de *C. parapsilosis*, propuseram a separação dos grupos em espécies distintas: *C. parapsilosis sensu stricto* (correspondente ao grupo I), *C. orthopsilosis* (grupo II) e *C. metapsilosis* (grupo III).

Em geral, os isolados de *C. parapsilosis* são susceptíveis à maioria dos agentes antifúngicos, incluindo anfotericina B e derivados azólicos. Estudo recente, conduzido por van Asbeck e colaboradores em 2008, avaliou a susceptibilidade das três espécies do complexo *C. parapsilosis* ao fluconazol, caspofungina e anidulafungina, encontrando MICs (concentração inibitória mínima) para os dois últimos fármacos significativamente mais elevados em *C. parapsilosis sensu strictu*, enquanto *C. metapsilosis* foi a

menos sensível ao fluconazol. Estas observações demonstram que podem ocorrer diferenças quanto à susceptibilidade aos antifúngicos entre as espécies (van Asbeck *et al.*, 2009).

Em pacientes neutropênicos e portadores de neoplasias hematológicas, *C.tropicalis* é a mais freqüente causa de candidemias. Nos EUA, a freqüência de isolamento vem decrescendo com o uso de fluconazol profilático, sendo a quarta espécie mais isolada. No entanto, em países da América Latina e no Brasil, ocupa o segundo lugar, juntamente com *C.parapsilosis* (Nucci e Colombo, 2007; Pfaller e Diekema, 2007). Mais recentemente, os testes de susceptibilidade aos antifúngicos passaram a revelar um número relativamente grande de isolados de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol. Entretanto, após reavaliação desses testes, observou-se que a espécie apresenta, com maior freqüência quando comparada às demais, o fenômeno do *trailing* (inibição incompleta de crescimento), resultando em MICs artificialmente elevadas. Alguns autores relataram o fenômeno em mais de 50% dos isolados que, na verdade, eram susceptíveis ao fluconazol (Arthington-Skaggs *et al.*, 2002; Pfaller *et al.*, 2006). Alterações na temperatura de incubação e no pH do meio utilizado para o preparo dos inóculos das leveduras, eliminam a ocorrência do fenômeno (Agrawal *et al.*, 2007).

Candida krusei é isolada com maior freqüência de pacientes com neoplasias hematológicas, mas a freqüência de isolamento é relativamente baixa, em geral em torno de 4% dos casos; este índice tem permanecido estável nos últimos anos. É uma levedura intrinsecamente resistente ao

fluconazol e apresenta baixa sensibilidade à anfotericina B e à 5-fluorocitosina. O voriconazol e as equinocandinas demonstram excelente atividade *in vitro*, mas alguns autores vêm relatando diminuição da sensibilidade em pacientes com infecção por *C. krusei* (Colombo e Guimarães, 2003; Pfaller e Diekema, 2007; Barbedo e Sgarbi, 2010).

Um potente fator de virulência relacionado a algumas espécies de *Candida* é a formação de biofilme, resultante da produção de polímeros extracelulares que aderem a diversos tipos de superfícies, tais como cateteres intravenosos, em resposta ao sistema imune do hospedeiro e à terapêutica antifúngica. Os possíveis mecanismos de resistência incluem a dificuldade na penetração do medicamento através da matriz, a expressão de bombas de efluxo de fármacos durante a fase inicial da formação de biofilme e alterações na composição do esterol da membrana (Douglas, 2002; Mukherjee e Chandra, 2004; d'Enfert, 2006; Bizerra *et al.*, 2008).

As técnicas convencionais para identificação das espécies de *Candida* são baseadas fundamentalmente na micro-morfologia e em provas bioquímicas, como a assimilação (auxanograma) e a fermentação (zimograma) de carboidratos e fontes de nitrogênio. Os sistemas manuais mais utilizados na rotina clínica são o API 20 AUX[®] e o ID 32C[®], enquanto os métodos automatizados mais difundidos são o Vitek[®] e o Microscan[®]. Os meios de isolamento cromogênicos, entre os quais se destaca o CHROMagar[®], possibilitam a identificação presuntiva das espécies de *Candida* e a ocorrência de culturas mistas (Ellepola e Morrison, 2005).

Entretanto, nos últimos anos, o aumento na prevalência de infecções fúngicas e o tempo prolongado que as técnicas microbiológicas clássicas demandam para fornecer o diagnóstico, levaram ao desenvolvimento de testes moleculares, que têm resultado em maior precisão e rapidez na detecção e identificação de leveduras do gênero *Candida* (Ciardo *et al.*, 2006; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2007).

A maior parte do genoma haplóide de *Candida* consiste de DNA mitocondrial e DNA ribossômico (DNAr), este último presente em número de cópias variando de 50 a 100, com arranjo *in tandem* (Beckerman e Magee, 2002; Odds *et al.*, 2004). No DNAr existem três regiões codificadoras relativamente conservadas: uma região 18S, com cerca de 1.800 pares de base; uma sequência altamente conservada de 5.8S, com 160 pares de base; e a região 28S com cerca de 3.400 pares de base. Flanqueando a região 5.8S, existem regiões de seqüências variáveis denominadas de *internal transcribed spacer regions* (ITS), cuja função não é completamente conhecida. No entanto, experimentos demonstram que sua remoção antes da etapa de transcrição, causa efeito deletério na formação do RNA ribossômico maduro (Iwen *et al.*, 2002).

Como as regiões ITS1 e ITS2 mostram grande variabilidade entre microrganismos do mesmo grupo, podem ser utilizadas para a identificação das espécies de *Candida* em testes moleculares, além de aumentarem o poder de detecção dos métodos de amplificação, por estarem presentes em múltiplas cópias (Chen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002).

A necessidade de se compreender os mecanismos fisiopatológicos, bem como o conhecimento sobre a epidemiologia, evolução, taxonomia e padrões de susceptibilidade a antifúngicos em isolados de *Candida* spp., têm conduzido a estudos que empregam diversas técnicas moleculares de identificação e tipagem, entre elas MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), RAPD, PCR-RFLP, SSCP (*Single-strand Conformational Polymorphism*) e o seqüenciamento automatizado, este último considerado o padrão-ouro para a identificação de polimorfismos (Chen *et al.*, 2002; Boriollo *et al.*, 2006).

A técnica de SSCP consiste em uma eletroforese de alta resolução, que utiliza a poliacrilamida como matriz, sendo baseada na diferença de migração de fragmentos de DNA de fita simples amplificados por PCR, em função de sua estrutura conformacional e peso molecular. Diversos autores têm relatado elevada sensibilidade desta técnica, permitindo a diferenciação de fragmentos de DNA que variam em apenas uma base (Walsh *et al.*, 1995; Díaz-Lopes *et al.*, 2004). A técnica tem sido empregada para a identificação rápida de leveduras, como alternativa aos métodos fenotípicos, bem como em estudos de tipagem por micro-satélites e sua correlação com resistência aos antifúngicos (Wang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008).

Os antifúngicos mais utilizados no tratamento de infecções por *Candida* spp. incluem os derivados imidazólicos (miconazol e cetoconazol), os triazóis de 1ª geração (itraconazol e fluconazol) e os de 2ª geração (voriconazol, posaconazol e ravuconazol). Dentre estes, destaca-se o fluconazol, pela eficácia terapêutica, custo relativamente baixo, boa

tolerância e baixa incidência de efeitos adversos, sendo freqüentemente prescrito, de forma empírica, a pacientes com suspeita de infecção por *Candida* (Colombo e Guimarães, 2003; Chen e Sobel, 2005; Pfaller e Diekema, 2007).

O fluconazol atua especificamente inibindo a enzima lanosterol-14- α -demetilase, pertencente ao sistema enzimático microssomal do complexo citocromo P-450, que promove a conversão de lanosterol a ergosterol. O acúmulo dos precursores leva à redução da permeabilidade da membrana plasmática do fungo, conferindo uma ação fungistática (Akins, 2005). Kelly e colaboradores em 1995, propuseram que o grupo hidroxila no carbono 6 do composto intermediário 14-metilergosta-8,24(28)-dieno-3,6-diol, impede interações hidrofóbicas com os fosfolipídios da membrana plasmática, tornando-a permeável. O ergosterol é o componente da membrana celular dos fungos que exerce funções semelhantes às do colesterol em células animais. Uma vez que células humanas não possuem ergosterol em suas membranas, os derivados azólicos atuam de modo seletivo nas células fúngicas (Kelly *et al.*, 1995).

Durante as últimas duas décadas, com o aumento do número de pacientes imunodeprimidos e imunossuprimidos, a prevalência e gravidade das candidíases aumentaram de forma expressiva. O uso repetitivo ou exposição prolongada aos fármacos antifúngicos, em pacientes portadores de candidíase recorrente, tem aumentado significativamente o número de casos de resistência *in vitro* correlacionados com falha terapêutica (White *et al.*, 1998; Cowen *et al.*, 2000). Além disso, *C. krusei* é intrinsecamente

resistente ao fluconazol, uma vez que a afinidade entre o antifúngico e o substrato encontra-se reduzida (Guinea *et al.*, 2006).

Com o aumento do número e consumo dos antifúngicos disponíveis para tratamento e profilaxia das infecções por *Candida*, o desenvolvimento de testes de susceptibilidade de leveduras a esses medicamentos se tornou relevante. Em 1997, após extenso trabalho de padronização, o NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) aprovou a utilização dos métodos de microdiluição (documento M27-A) para a determinação da susceptibilidade de *Candida* spp. a antifúngicos. Esta metodologia, atualmente na versão M27-A3 (CLSI, 2008), tem sido amplamente utilizada em diferentes centros médicos de referência para a avaliação da sensibilidade ou resistência de isolados de amostras clínicas (Perea & Patterson, 2001).

Testes de susceptibilidade disponíveis comercialmente, entre eles o Etest[®] e o Sensititre Yeast One[®], aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration* - EUA), apresentam boa correlação com a metodologia de referência, possuindo ainda a vantagem de permitirem a determinação das MICs no prazo de 24 horas, enquanto o método da micro-diluição preconiza 48 horas para definir os resultados (Alexander *et al.*, 2007; Pfaller *et al.*, 2008).

1.1 Mecanismos de resistência ao fluconazol

Resistência é um fenômeno que ocorre *in vitro*, e pode estar ou não associada à falha terapêutica. Fatores relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica do antifúngico, bem como aqueles relacionados ao hospedeiro e à espécie causadora da infecção, estão envolvidos nas diferenças que existem entre susceptibilidade *in vitro* e resposta clínica ao tratamento (Pfaller *et al.*, 2006; Pfaller e Diekema, 2007).

Diversos estudos têm sido realizados para elucidação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de resistência aos azóis em isolados clínicos de *Candida* spp. Muito embora esses mecanismos possam ocorrer simultaneamente na célula fúngica, foram didaticamente categorizados em quatro grupos (Chau *et al.*, 2004; Morschhäuser, 2002; White, 2002; Perea *et al.*, 2001; Sanglard *et al.*, 1998):

1.1.1 Super expressão de bombas de efluxo

Um importante mecanismo de resistência aos azóis é desencadeado pela redução do acúmulo intracelular do medicamento. Nos últimos anos, estudos realizados com fluconazol mostraram evidências de que este medicamento é ativamente transportado ao meio externo pelas células fúngicas, de uma maneira dependente de energia, e que o maior efluxo do

antifúngico é causado pela super expressão de genes que codificam proteínas transportadoras de membrana (Morschhäuser, 2002).

Os genes CDR1 e CDR2 (*Candida Drug Resistance*), localizados no cromossomo 3 de *Candida*, codificam proteínas transportadoras do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), que atuam como bombas de efluxo transmembranas e utilizam a hidrólise do ATP para mobilizar uma variedade de pequenos compostos hidrofóbicos para fora da célula (Akins, 2005). Em *Saccharomyces cerevisiae*, há pelo menos 31 genes que codificam proteínas do tipo ABC (Bauer *et al.*, 1999); enquanto no genoma de *C. albicans*, há apenas seis, sendo que CDR1 a CDR4 têm sido analisados funcionalmente e, até o presente, somente os genes CDR1 e CDR2 foram associados à resistência aos azóis (Akins, 2005).

Além de CDR1 e CDR2, outro gene conhecido como MDR1 (*Multidrug Resistance*) também está envolvido no sistema de transporte dependente de energia. A proteína codificada por MDR1 atua como transportadora de membrana do tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*) pertencente à superfamília das permeases, e utiliza gradiente de prótons para o transporte de compostos. Esta proteína transmembrana é encontrada em fungos, bactérias e no homem (Morschhäuser, 2002; Akins, 2005).

As bombas de efluxo têm a capacidade de transportar ao meio externo, entre outros compostos, alguns antifúngicos, porém não em quantidade suficiente para conferir resistência (Akins, 2005). No entanto, algumas linhagens de *Candida* podem apresentar super expressão dos genes CDR e MDR, aumentando o número de bombas transportadoras em

suas membranas e reduzindo o acúmulo do antifúngico no meio intracelular. Observou-se acréscimo nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) de CDR1, CDR2 e MDR1 em isolados resistentes quando comparados a isolados susceptíveis (Sanglard *et al.*, 1995; Franz *et al.*, 1999). Esse mecanismo de super expressão pode conferir resistência aos azóis, incluindo fluconazol, cetoconazol, miconazol, voriconazol e itraconazol, além de terbinafina e cicloheximida (Morschhäuser, 2002; Chau *et al.*, 2004; Akins, 2005). Não obstante, White e colaboradores em 2002, identificaram isolados clínicos susceptíveis apresentando super expressão de CDR1.

A deleção do gene CDR1 e a inativação de MDR1 conferem hiper susceptibilidade aos azóis em *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1996; Wirsching *et al.*, 2000), enquanto que a deleção de CDR2 confere hiper susceptibilidade apenas em linhagens com deleção simultânea de CDR1 (Sanglard *et al.*, 1997).

Recentemente, um gene homólogo ao CaMDR1, o CaFLU1, foi estudado pela sua capacidade de conferir resistência ao fluconazol quando transfectado em *S. cerevisiae* hiper susceptíveis (expressão heteróloga; Calabrese *et al.*, 2000). A inativação de FLU1 em uma cepa de *C. albicans* nos quais vários outros genes de resistência a múltiplas drogas foram eliminados, resultou em aumento da susceptibilidade ao fluconazol, demonstrando que FLU1 pode mediar a resistência ao antifúngico em *C. albicans*. No entanto, a super expressão de FLU1 ainda não foi encontrada em isolados de *C. albicans* de pacientes com resistência clínica ao fluconazol (Morschhäuser, 2002).

1.1.2 Alteração na biossíntese do ergosterol

O ergosterol é essencial para manter a integridade e função da membrana plasmática dos fungos e, por esse motivo, a sua biossíntese é alvo para muitos antifúngicos, incluindo o fluconazol. Esta via biossintética tem por finalidade converter ácido acético em ergosterol utilizando diversas enzimas, como ocorre na biossíntese do colesterol em mamíferos (Lamb *et al.*, 1999).

O alvo primário dos antifúngicos da classe dos azóis é a 14 α -demetilase (ERG11p ou 14DM), enzima chave na síntese do ergosterol, membro da superfamília dos citocromos P-450, que catalisa a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil do lanosterol (Aoyama *et al.*, 1989). A inibição da ERG11p pelo fluconazol não resulta somente na redução do ergosterol, mas também no acúmulo de seu precursor, o lanosterol. Este é convertido em 14 α -metilfecosterol e, subsequentemente, catalisado pela Δ 5,6-dessaturase (enzima codificada pelo gene ERG3 que age em uma etapa anterior à ERG11p) para o esteroide intermediário, 14 α -metilergosta-8,24(28)-dien-3,6diol, composto tóxico que inibe o crescimento celular (Kelly *et al.*, 1995; Kelly, 1997; Akins, 2005). Alguns autores acreditam que não é a falta de ergosterol que provoca a inibição do crescimento da levedura, mas o acúmulo dos intermediários tóxicos (Lamb *et al.*, 1999). A inativação da Δ 5,6-dessaturase pelas células de levedura expostas aos derivados azólicos impossibilita a produção do metabólito tóxico 14 α -metilergosta-8,24(28)-dien-3,6diol, promovendo o acúmulo do composto 14 α -metilfecosterol, que

permite o crescimento celular. Deste modo, leveduras com alteração nesta etapa enzimática, apresentam vantagem seletiva quando submetidas à ação dos azóis (Kelly *et al*, 1995; Kelly, 1997; Akins, 2005).

Miyazaki e colaboradores, em 2001, demonstraram que a deleção do gene ERG3 em *C. albicans* resultou na redução da susceptibilidade dos mutantes ao fluconazol, fornecendo evidência direta de que a alteração na biossíntese do ergosterol, em especial a inativação da enzima $\Delta 5,6$ -dessaturase, pode causar resistência ao fluconazol.

1.1.3 Mutações no gene ERG11

Uma causa freqüente de resistência é decorrente da alteração na configuração espacial da enzima alvo dos antifúngicos azólicos, a 14 α -demetilase (Erg11p ou 14DM), enzima-chave na via de biossíntese do ergosterol. Seu gene codificante, ERG11, localiza-se no cromossomo 5 e possui variação no número e seqüência de nucleotídeos de acordo com a espécie, apresentando pesos moleculares variando de 1.569 pares de bases para *C. parapsilosis* a 2.669 para *C. glabrata* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

Mutações em ERG11 podem resultar em alterações pós-traducionais na seqüência de aminoácidos e, conseqüentemente, na estrutura tridimensional de Erg11p, ocasionando decréscimo na afinidade de ligação entre o componente azólico e a proteína, sem impedir sua função, porém

gerando leveduras com fenótipo alterado resistente aos azólicos (Sanglard *et al.*, 1998; Favre *et al.*, 1999).

Para identificar alterações na ERG11p que podem acarretar resistência ao fluconazol, diversos estudos compararam a sequência do gene ERG11 de linhagens de *C. albicans* resistentes a seqüências do mesmo gene de cepas sensíveis. Forte evidência deste mecanismo foi obtida pela comparação entre seqüências de alelos do gene ERG11 de isolados resistentes e susceptíveis ao fluconazol, em diferentes episódios de infecção em um mesmo paciente. A mutação R467K foi identificada em ambos os alelos de um isolado de *C. albicans* resistente, obtido de paciente no qual haviam sido anteriormente isoladas leveduras da mesma espécie com sensibilidade elevada (White, 1997).

Alteração de heterozigosidade para homozigotia em uma mutação do gene ERG11 parece conferir maior resistência da levedura ao fluconazol. Esta mudança foi encontrada em isolados clínicos com as mutações G464S ou R467K (White, 1997; Franz *et al.*, 1998). Análises genéticas sugerem que uma célula com duas cópias do R467K é significativamente mais resistente do que uma célula na qual apenas um alelo tem a mutação. A pressão seletiva, exercida pela presença de fluconazol, parece favorecer a conversão para homozigosidade (White *et al.*, 1998).

Outra abordagem bem-sucedida para demonstrar o envolvimento de mutações em ERG11 no desenvolvimento de resistência ao fluconazol é a expressão heteróloga de diferentes alelos de CaERG11 em *S. cerevisiae*, por meio da comparação entre a susceptibilidade de linhagens que

expressam e das que não expressam o alelo. As trocas de aminoácidos F126L, G129A, Y132H, T229A, G307S, S405F, G464S e R467K foram associadas à resistência ao antifúngico (Sanglard *et al.*, 1998; Perea *et al.*, 2001).

Evidências de que determinadas mutações resultam em diminuição da afinidade ao antifúngico, foram fornecidas pela análise bioquímica das enzimas heterologamente expressas. A afinidade ao fluconazol, de ERG11p contendo as mutações Y132H, G464S ou R467K, foi reduzida quando comparada à enzima do tipo selvagem, confirmando que estas mutações podem acarretar resistência em *C. albicans* (Kelly *et al.*, 1999; Lamb *et al.*, 2000)

É importante salientar que existem alguns fenótipos de resistência que só se expressarão quando uma determinada mutação ocorrer simultaneamente à outra, ou de forma combinada a outras na seqüência do gene ERG11. Por exemplo, as mutações G129A e G464S resultam em aumento significativo dos valores de MIC para compostos azólicos, quando comparadas a linhagens que possuem somente a mutação G464S (Sanglard *et al.*, 1998).

Diversos estudos têm identificado mutações no gene ERG11 em isolados de *C. albicans* resistentes ou sensíveis aos azóis (**Apêndice 3**); para espécies como *C. krusei* e *C. glabrata* essas mutações têm sido pouco estudadas, estando disponível na literatura apenas um estudo com *C. krusei* e quatro com *C. glabrata*. Apenas no estudo realizado com *C. krusei* foram identificadas mutações de sentido trocado: D434A e K456R (Fukuoka *et al.*,

2003; Brun *et al.*, 2004; Sanguinetti *et al.*, 2005; Vandeputte *et al.*, 2009; Berila e Subik, 2010).

Em relação a *C. tropicalis*, há dois estudos sobre mutações no gene ERG11 relacionadas à resistência ao fluconazol (Loëffler *et al.*, 2000; Vandeputte *et al.*, 2005). Apenas no estudo de 2005 foi identificada uma mutação de sentido trocado (Y132F). Esta alteração já havia sido descrita anteriormente em *C. albicans*, conferindo resistência (Chau *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2004). Até o momento, não há relatos na literatura de estudos sobre mutações no gene ERG11 de isolados do complexo *C. parapsilosis*.

Na América Latina, há apenas um estudo realizado no Brasil, no qual os autores identificaram 14 novas mutações no gene ERG11 de isolados clínicos de *C. albicans*, obtidos de pacientes infectados pelo HIV. Entretanto, a relação das mutações com a resistência ao fluconazol não foi validada no estudo (Goldman *et al.*, 2004).

1.1.4 Super expressão do gene ERG11

Em presença de fluconazol, *C. albicans* aumenta a expressão do gene ERG11, provavelmente por mecanismo compensatório à depleção do ergosterol (Albertson *et al.*, 1996). Entretanto, Franz e colaboradores, em 1998, relataram que, mesmo na ausência de fluconazol, alguns isolados

resistentes expressam ERG11 em níveis superiores aos encontrados em isolados susceptíveis expostos ao antifúngico.

O aumento da expressão do gene ERG11 resulta em incremento da concentração da enzima 14 α -demetilase no ambiente intracelular, e conseqüentemente, acarreta a necessidade de quantidades maiores de antifúngico para inibir a atividade da enzima (Morschhäuser *et al.*, 2002). Este mecanismo tem sido encontrado em diversos isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (Perea *et al.*, 2001; Withe *et al.*, 2002; Chau *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2004).

Embora a super expressão do gene ERG11 tenha sido descrita como mecanismo de resistência, dados recentes indicam que este fenômeno não está necessariamente relacionado à resistência aos azóis em *C. albicans*, uma vez que quando detectado, está freqüentemente associado ao aumento da expressão de genes codificadores de bombas de efluxo (Perea *et al.*, 2001; Withe *et al.*, 2002; Chau *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A identificação e o entendimento dos mecanismos que fazem com que mutações presentes no gene ERG11 possam influenciar a ligação da proteína ERG11p ao antifúngico, possibilitam novas informações para o desenvolvimento de fármacos, em que esta interação esteja preservada. Além disso, essas mutações foram pouco estudadas em diferentes espécies de *Candida não albicans*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar mutações pontuais no gene ERG11 de isolados clínicos de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, previamente avaliados quanto à susceptibilidade ao fluconazol.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar as espécies de *Candida* pela amplificação da região ITS do DNAr, confirmando os métodos fenotípicos de identificação, e discriminar as três espécies do complexo *C. parapsilosis* por seqüenciamento automatizado.
2. Delinear *primers* para amplificar o exon do gene ERG11 de *Candida tropicalis*, do complexo *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, e desenvolver sistemas de amplificações para cada espécie.
3. Avaliar a técnica de SSCP como método de triagem para detectar mutações no gene ERG11;
4. Determinar, por meio de seqüenciamento automatizado, o tipo de mutação, sua localização e freqüência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados de *Candida* e cepas de referência

Os isolados de *Candida* utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pela Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, devidamente identificados pela micro-morfologia e testes bioquímicos clássicos. Para garantir o fornecimento de colônias puras, todos os isolados foram semeados em meio cromogênico CHROMagar™ (Becton-Dickinson).

O grupo de isolados consistiu de: 32 *Candida albicans*; 34 *C. tropicalis*; 6 *C. glabrata*; 4 *C. krusei*; e 11 pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*, num total de 87 amostras isoladas de sangue, orofaringe, urina e cavidade oral, e coletadas de pacientes internados em diversas unidades hospitalares da cidade de São Paulo e de outros municípios do Brasil.

Foram também utilizadas cepas de referência de *Candida* (*American Type Culture Collection* - ATCC), com padrões definidos de sensibilidade ou resistência ao fluconazol (CLSI, 2008): *C. krusei* ATCC 6258 (MIC 32µg/ml), *C. albicans* ATCC 64550 (MIC 16µg/ml), *C. tropicalis* ATCC 200956 (MIC 16µg/ml), *C. glabrata* ATCC 90030 (MIC 8µg/ml) e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (MIC 0,25µg/ml).

4.2 Testes de susceptibilidade ao fluconazol

Os testes de susceptibilidade ao fluconazol foram realizados na Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pelo método da micro-diluição em caldo, de acordo com o protocolo descrito no documento M27-A3 (CLSI, 2008). Os padrões de sensibilidade são definidos empregando-se diluições seriadas do antifúngico, até atingir a concentração mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento do microrganismo em 50%.

Segundo o documento M27-A3, para leveduras do gênero *Candida*, os isolados são classificados como susceptíveis quando os valores de MIC para fluconazol são iguais ou inferiores a 8 µg/ml; isolados com susceptibilidade dose-dependente para valores entre 16 e 32 µg/ml; e resistentes, aqueles cujo crescimento é inibido por concentrações iguais ou maiores que 64 µg/ml do antifúngico. Entretanto, o mesmo documento preconiza que o intervalo que define o isolado como sensível ao fluconazol não está ainda bem estabelecido, podendo o “ponto de corte”, ser de 4 ou 8 µg/ml. O M27-A3 também refere que os isolados de *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol, não devendo ser interpretados os valores de MIC encontrados para essa espécie (CLSI, 2008).

Deste modo, 70 isolados foram classificados como susceptíveis, e entre eles, todos os pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*; oito isolados revelaram-se susceptíveis dose-dependentes (cinco isolados de *C. albicans*, dois de *C. glabrata* e um de *C. tropicalis*), e nove como resistentes ao

fluconazol (todos os de *C. krusei*, quatro *C. albicans* e um *C. tropicalis*) (Apêndice 1).

4.3 Extração de DNA de *Candida* (isolados e cepas de referência)

As extrações de DNA foram realizadas a partir da suspensão das leveduras contendo 10^6 células/ml, de acordo com o método descrito por van Burik e colaboradores em 1998, com algumas modificações. Um mililitro da suspensão foi submetido à centrifugação a 15.300g por 10 minutos (microcentrífuga 5417R, Eppendorf) e, ao “*pellet*” de células foram adicionados 600 µl de solução contendo 50mM Tris, 10mM EDTA, 250U/ml de liticase (L4276, Sigma) e 10% de β-mercaptoetanol (Merck). Os tubos foram mantidos a 37°C por 2h30min para a digestão da parede celular e, em seguida, submetidos à agitação vigorosa em vórtex. Foram então adicionados à suspensão dos esferoplastos, 0,2% de SDS e 20 µg/ml de proteinase K (Sigma) e os tubos mantidos a 65°C por 45 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 15.300g por 10 minutos, e os sobrenadantes transferidos para tubos limpos. Para a precipitação do DNA, adicionou-se isopropanol (Merck) v/v, e as amostras foram mantidas a -20°C por uma noite. Após centrifugação a 19.400g e 4°C por 20 minutos, foram adicionados ao “*pellet*” contendo o DNA, 500 µl de etanol a 70% e os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos. O “*pellet*” final de DNA foi solubilizado em solução de Tris-EDTA (10mM Tris Base, 1mM EDTA) e

sua concentração foi estimada por espectrofotometria UV (Nanodrop 1000, Thermo) em comprimentos de onda de 260nm e 280nm. O índice de pureza foi determinado por meio da razão 260nm/280nm e considerado adequado na faixa de 1,8-2,0.

4.4 Identificação molecular dos isolados de *Candida*

A identificação fenotípica das espécies de *Candida* incluídas no estudo foi confirmada por amplificação de fragmento da região ITS do DNA ribossomal. Foram selecionados da literatura *primers* espécie-específicos, cujos produtos resultantes das amplificações por PCR, apresentam peso molecular variável, na dependência da espécie (**Apêndice 2**).

Os componentes da solução de amplificação e respectivas concentrações foram assim definidos: tampão de reação 1x (LGC), 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 0,2 µM de cada *primer* (IDT), 1,5 mM de MgCl₂ (LGC), 1,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase (LGC) e 10ng de DNA molde, em 50 µl de volume final de reação. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra), de acordo com o seguinte protocolo: etapa de denaturação inicial de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52-55°C e 1 minuto a 72°C, seguidos de uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Confirmada a identificação das espécies pela PCR, os 11 isolados do complexo *C. parapsilosis* foram submetidos a uma nova amplificação com

primers ITS1 e ITS4, empregando-se os mesmos componentes de reação e respectivas concentrações acima descritos, e 5 ng de DNA molde. A amplificação foi realizada em termociclador (Biometra) utilizando-se o seguinte protocolo: etapa de denaturação inicial de 5 minutos a 95°C; seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 64°C e 1 minuto a 72°C, e uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C. Em seguida, os produtos da PCR foram submetidos ao seqüenciamento automatizado, para determinar a qual das três espécies do complexo *C. parapsilosis* os 11 isolados pertenciam.

4.5 Protocolo para amplificação do gene ERG11

Os *primers* utilizados para amplificar o gene ERG11 de *C. albicans* foram descritos previamente por Xu e colaboradores (2008) e amplificam três regiões, com cerca de 480 pares de base. Os demais oligonucleotídeos foram delineados neste estudo, com auxílio do *software* *Primer-BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) e seqüências do gene ERG11 depositadas no *GenBank* para cada espécie de *Candida*. Estes *primers* foram delineados para amplificar o gene em regiões contíguas, gerando assim fragmentos com pesos moleculares de aproximadamente 400 pares de base, passíveis de análise pela técnica de SSCP.

Para a padronização da PCR, todos os reagentes utilizados nas amplificações foram avaliados em diversas concentrações, até que a

combinação destas apresentasse o melhor desempenho de amplificação. As ciclagens foram padronizadas em termociclador Gradient Palm-Cycler (Corbett), utilizando-se gradiente de temperatura de hibridização entre 58 e 65°C.

Os produtos de amplificação foram detectados em eletroforese horizontal (Horizon H-58, Life Technologies), utilizando-se agarose (Invitrogen) a 2% como matriz, tampão Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 1x, sob tensão elétrica de 90 V. Em seguida, os géis foram revelados em solução de TAE 1x acrescida de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Os resultados foram registrados em sistema de foto-documentação com transiluminador UV (Vilber Lourmat).

4.6 Eletroforese SSCP

Os produtos de amplificação das PCR foram desnaturados em termociclador (Biometra) à 95°C por 15 minutos, após adição da solução-tampão de corrida (formamida 98%, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%) na proporção 1:1. Após resfriamento em gelo durante 5 minutos, as amostras foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida (Sigma), nas concentrações de 6, 8 e 10%. As eletroforeses foram realizadas em tampão Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 1x, em cuba de eletroforese vertical SE600 e fonte EPS 1001 (GE Healthcare). As condições

de eletroforese foram padronizadas variando a amperagem e tempo de corrida.

Após eletroforese, os géis foram fixados em etanol a 10% por 30 minutos. Na etapa de coloração (modificada de Bassam *et al.*, 1991), os géis foram imersos em solução de ácido nítrico a 1%, durante 15 minutos, sob agitação constante; posteriormente foram submetidos à lavagem com água destilada por 1 minuto e, em seguida, foram submersos em 250 ml de solução de nitrato de prata a 0,2%, acrescida de 375 µl de formaldeído 37%, por 30 minutos. Os géis foram então submetidos a duas lavagens com água destilada de 1 minuto. Para a revelação das bandas, foram submersos em 250 ml de solução de carbonato de sódio a 30%, acrescida de 185µl de formaldeído 37%, sob agitação constante, até o aparecimento das bandas. Em seguida, os géis foram imersos em solução de ácido acético a 10% durante 15 minutos, para interromper a reação de precipitação. As bandas foram visualizadas em negatoscópio e os géis fotografados com câmera digital (Canon Power Shot SD1000).

4.7 Seqüenciamento automatizado dos amplificadores

Os produtos das amplificações das regiões do gene ERG11 selecionados para seqüenciamento, bem como os amplificadores da região ITS dos 11 isolados do complexo *C. parapsilosis*, foram purificados com a utilização do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), de

acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida, foram submetidos às reações de amplificação pela técnica de Sanger e colaboradores em 1977, com os *primers forward* e *reverse* separadamente, empregando-se 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 64°C e 1 minuto a 72°C. Os seqüenciamentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica em Imunodeficiências (LIM-56) do HC-FMUSP, na plataforma MegaBace-1000 (GE Healthcare), sob tensão elétrica de injeção de 3kV por 80 segundos, e eletroforese em 9kV por 120 minutos.

As seqüências obtidas para cada amplificado foram analisadas com o auxílio do *software ChromasPro* (Technelysium), tendo sido estabelecida uma seqüência consenso entre a fita *forward* e *reverse*. Cada seqüência consenso foi submetida ao alinhamento com a respectiva seqüência “selvagem”, utilizando-se o *software* de alinhamento global *ClustalW2* (Larkin *et al.*, 2007), disponível em <http://www.clustal.org/>.

As análises dos isolados do complexo *C. parapsilosis* foram realizadas utilizando-se as seqüências do *GenBank*: FJ872018 para *C. orthopsilosis* (CBS 10906); FJ872019 para *C. metapsilosis* (CBS 10907); e AY939798 para *C. parapsilosis sensu stricto* (ATCC 22019).

Para o alinhamento de *C. albicans*, foi utilizada como referência a seqüência descrita por Lai e Kirsch em 1989, com número de acesso X13296 (*GenBank*). Para *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, foram utilizados consensos obtidos pelo alinhamento de cinco seqüências disponíveis de cada espécie no *GenBank*.

Quando alterações ainda não descritas na literatura foram identificadas nas sequências analisadas, os fragmentos foram novamente amplificados por PCR e submetidos a uma segunda reação de sequenciamento, para a confirmação dos resultados.

As mutações encontradas foram caracterizadas quanto à natureza, com o auxílio da tabela universal do código genético (Nirenberg *et al.*, 1965), respeitando a tradução diferencial das leveduras do gênero *Candida* para o códon CUN (Moura *et al.*, 2010). As alterações foram localizadas na sequência de aminoácidos da ERG11p através de uma predição da proteína, realizada com o auxílio do software de tradução *ExPASy Translate Tool* (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>).

4.8 Controle dos processos de amplificação e dos riscos biológicos

Nos Laboratórios de Investigação Médica em Pediatria Clínica (LIM-36) do Instituto da Criança - HC-FMUSP e em Micologia Médica (LIM-53) do IMTSP/USP, onde este estudo foi realizado, são aplicados processos que objetivam a minimização dos riscos de contaminação das amplificações, a saber: compartimentalização do espaço físico em três áreas (preparo dos reagentes, extração das amostras clínicas e reações de amplificação), utilização de reagentes de lote controlado e em alíquotas para evitar diversos ciclos de congelamento e descongelamento dos mesmos, uso de

material descartável “DNase” e “RNase-free”, jogos de micropipetas e instrumental específico de cada área, aventais, luvas descartáveis, etc.

Utiliza-se ainda protocolo específico para a inativação do brometo de etídeo antes de seu descarte (Lunn e Sansone, 1987). Os géis corados com brometo são desprezados em recipientes apropriados para resíduos químicos, e posteriormente enviados para incineração. A visualização dos géis em transiluminador pela luz ultravioleta é realizada em sistema de fotodocumentação, que dispensa o uso de óculos de proteção.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação molecular dos 87 isolados de *Candida*

Os 87 isolados foram submetidos à identificação molecular pela PCR com *primers* espécie-específicos (**Apêndice 2**), que confirmou as identificações realizadas previamente pela micro-morfologia e testes bioquímicos em todos os isolados.

A análise do seqüenciamento automatizado da região ITS1/ITS4 dos isolados identificados como complexo *C. parapsilosis* revelou que aqueles de numeração 44, 51, 59, 68, 100, 366 e 400 (7/10) pertencem à espécie *C. parapsilosis sensu stricto*; e os isolados 22, 23 e 57 (3/10) à espécie *C. orthopsilosis*. Nenhum isolado foi identificado como *C. metapsilosis* (os alinhamentos entre as seqüências obtidas e as de referência encontram-se nos **Anexos A a J**). A cepa ATCC 22019 utilizada como referência nos testes de susceptibilidade foi confirmada como *C. parapsilosis sensu stricto* (**Anexo L**).

5.2 Delineamento dos *primers* e amplificação do gene ERG11 das cinco espécies de *Candida*

As seqüências dos *primers*, bem como a região do gene ERG11 amplificada e os respectivos pesos moleculares dos amplificados estão descritos na **Tabela 1**.

Os *primers* empregados para amplificar o gene ERG11 de *C. albicans*, previamente descritos na literatura, amplificaram os três fragmentos do gene ERG11 dos 32 isolados da espécie. Os *primers* que amplificam o mesmo gene de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* contêm entre 20 e 25 pares de base, e foram delineados de tal modo, que juntos amplificaram toda a extensão do éxon de cada uma das espécies. Para *C. parapsilosis* foi delineado apenas um par de *primers*, pois no período inicial deste estudo, somente uma seqüência parcial do gene, de 430 pares de base, estava disponível no *GenBank*.

Todos os *primers* do estudo confirmaram ser espécie-específicos para o gene ERG11 quando foram realizados testes de especificidade com DNA genômico de outras espécies de *Candida*.

Para a realização das PCR empregadas para amplificar o gene ERG11 das cinco espécies de *Candida*, foram avaliadas temperaturas de hibridização entre 58° e 65°C, ficando definida a temperatura de 64°C como a mais restrigente, sem diminuir a eficiência da reação. Desta forma, o protocolo de amplificação ficou assim definido: etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto à 64°C e 1 minuto à 72°C; a seguir, uma etapa de extensão final de 5 minutos à 72°C.

Este protocolo foi empregado para as amplificações de todos os fragmentos do gene ERG11, com exceção do ERGSec1 de *C. albicans* (amplificado pelos *primers* ERGSec1A e ERGSec1B), para o qual foi definida, neste estudo, a temperatura de 60°C na etapa de hibridização.

As concentrações para cada reagente da PCR ficaram assim definidas: tampão de reação 1x; 200 μ M de cada deoxinucleotídeo trifosfato (GE Healthcare); 0,2 μ M de cada *primer*; 1,5 mM de $MgCl_2$; 1,5 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen) em 50 μ l de volume final de reação. A quantidade do DNA molde variou de 1 a 10ng, de acordo com a porção do gene amplificada e, para os fragmentos *CtERGr1*, *CtERGr2* e *CtERGr4* de *C. tropicalis*, foi necessária a adição de 15mM de sulfato de amônia à mistura de reagentes (**Tabela 2**). Todas as amplificações revelaram-se específicas, com apresentação de uma banda única e uniforme em gel de agarose a 2% (**Figura 1**).

Tabela 1 – *Primers* que amplificam o gene ERG11 de *C. albicans* (Xu *et al.*, 2008) e das demais espécies de *Candida*

Espécie	Gene	Start/Stop Codon	Primer	Região amplificada	Amplicon
<i>C. albicans</i> (<i>GenBank</i> 2503) Xu <i>et al.</i>, 2008	1851pb	148/1734pb	ERGSec1A (5'-TTAGTGTTTTATTGGATTCTTGGTT-3') ERGSec1B (5'-TCTCATTTTCATCACCAAATAAAGATC-3')	295 a 777pb	482pb
			ERGSec2A (5'-ACCAGAAATTACTATTTTCACTGCTTCA-3') ERGSec2B (5'-AAGTCAAATCATTCAAATCACCACT-3')	723 a 1204pb	481pb
			ERGSec3A (5'-AGGTGGTGATTTGAATGATTTGACTT-3') ERGSec3B (5'-GAAGTATAATCAGGGTCAGGCACCTT-3')	1179 a 1667pb	488pb
<i>C. glabrata</i> (<i>GenBank</i> 159461713)	2669pb	561/2162pb	CgERGr1-F: (5' ACTACAATAACATGTCCACTGA 3') CgERGr1-R: (5' GGGTGGTCAAGTGGGAGTAA 3')	550 a 957pb	408pb
			CgERGr2-F: (5' AGCTGCTTACTCCCACTTGACC 3') CgERGr2-R: (5' AGCTTGTGGGCATGGTCTCTC 3')	932 a 1343pb	412pb
			CgERGr3-F: (5' GCCCAACAAGCTATCTCTGGTA 3') CgERGr3-R: (5' TGTTTGGAATAGCGACATCTCTC 3')	1332 a 1749pb	418pb
			CgERGr4-F: (5' CCAAACACTTCTACGTTGTCCC 3') CgERGr4-R: (5' GCATCTAGTACTTTTGTCTGGATG 3')	1743 a 2166pb	424pb
<i>C. krusei</i> (<i>GenBank</i> 164430458)	1809pb	157/1743pb	CkERGr1-F: (5' CCTCTCTAGCAACAACAATGTCC 3') CkERGr1-R: (5' GCCCTTACCGAAAAACAGGAGTG 3')	140 a 567pb	428pb
			CkERGr2-F: (5' ACTCCTGTTTTCGGTAAGGGCG 3') CkERGr2-R: (5' CACCGGCACGCTTTGTATTG 3')	547 a 967pb	421pb
			CkERGr3-F: (5' CGTGCCGGTGGTGAAATCAA 3') CkERGr3-R: (5' GGCCCTTTGGAACAATGTACGA 3')	958 a 1354pb	397pb
			CkERGr4-F: (5' GTACATTGTTCCAAAGGGCCATT 3') CkERGr4-R: (5' GCTAGTTCTTTTGTCTTCTCTCC 3')	1335 a 1744pb	410pb
<i>C. parapsilosis</i> (<i>GenBank</i> 35384482)	430pb	1/430pb	CpERG-F: (5' TGCTAACTTGTTGATTGGTGT 3') CpERG-R: (5' AACTTCACCTGCGTCATTGGTAG 3')	1 a 427pb	427pb
<i>C. tropicalis</i> (<i>GenBank</i> 61189833)	2446pb	518/2104pb	CtERGr1-F: (5' TCTTTTGTCAACACAGTAATGGC 3') CtERGr1-R: (5' AACACCTTTACCAAAAACAGGAG 3')	500 a 907pb	408pb
			CtERGr2-F: (5' CTCCTGTTTTTGGTAAAGGTGTT 3') CtERGr2-R: (5' TGGATCAATATCACCGCTTTCTC 3')	885 a 1333pb	449pb
			CtERGr3-F: (5' GCGGTGATATTGATCCAAAGAG 3') CtERGr3-R: (5' TGGTATGAGCATAACCGGCAGA 3')	1317 a 1751pb	435pb
			CtERGr4-F: (5' TGCCGGTTATGCTCATACCACT 3') CtERGr4-R: (5' CTACTCCATGGTGATCTAAACC 3')	1732 a 2119pb	388pb

Tabela 2 – Nanogramas de DNA e concentração de sulfato de amônia $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ utilizados para as amplificações do gene ERG11 das cinco espécies de *Candida*.

Primer (espécie)	Nanogramas de DNA	[] de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
ERGsec1 (<i>C. albicans</i>)	10ng	-
ERGsec2 (<i>C. albicans</i>)	10ng	-
ERGsec3 (<i>C. albicans</i>)	10ng	-
CtERGr1 (<i>C. tropicalis</i>)	10ng	15mM
CtERGr2 (<i>C. tropicalis</i>)	10ng	15mM
CtERGr3 (<i>C. tropicalis</i>)	2,5ng	-
CtERGr4 (<i>C. tropicalis</i>)	10ng	15mM
CgERGr1 (<i>C. glabrata</i>)	5ng	-
CgERGr2 (<i>C. glabrata</i>)	1ng	-
CgERGr3 (<i>C. glabrata</i>)	2,5ng	-
CgERGr4 (<i>C. glabrata</i>)	2,5ng	-
CkERGr1 (<i>C. krusei</i>)	2,5ng	-
CkERGr2 (<i>C. krusei</i>)	2,5ng	-
CkERGr2 (<i>C. krusei</i>)	2,5ng	-
CkERGr2 (<i>C. krusei</i>)	2,5ng	-
CpERG (<i>C. parapsilosis</i>)	1ng	-

[] = concentração

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 2%, mostrando amplificações dos fragmentos 2 (A) e 3 (B) do gene ERG11 de *C. albicans*.
M = marcador de peso molecular (100 pb – GE Healthcare)
1 a 4 = isolados 06/05, 012/05, 148/02 e ATCC 64550 de *C. albicans*

5.3 Análise dos amplificados do gene ERG11 das cinco espécies de *Candida* por eletroforese SSCP

Foi observado maior poder de discriminação no perfil de bandas obtidas após eletroforese conformacional de fita simples (SSCP), quando foram empregados géis de poliacrilamida na concentração de 6%, com adição de glicerol a 5%. As condições de corrida ficaram assim definidas: eletroforese por um período de 5h30min, com amperagem constante de 45mA por gel e temperatura de 10°C.

No primeiro fragmento amplificado do gene ERG11 de *C. albicans* (ERGsec1), todos os 32 isolados apresentaram o mesmo padrão de migração; no segundo fragmento (ERGsec2), somente a cepa ATCC 64550 apresentou padrão diferenciado e, para o terceiro fragmento (ERGsec3), não foi possível observar um padrão predominante de migração (**Figura 2**).

Figura 2 – Gel de poliacrilamida a 6% mostrando diferentes padrões de mobilidade eletroforética (SSCP) do terceiro fragmento (ERGsec3) do gene ERG11, para alguns isolados de *C. albicans*

Para os 34 isolados de *C. tropicalis*, também foi observado um único padrão de migração para o fragmento 1 (CtERGr1). Porém, para os

fragmentos 2 e 3 (CtERGr2 e CtERGr3), o isolado 45170 e a cepa ATCC 200956 apresentaram padrões diferenciados (**Figura 3**). Ainda no fragmento 3, foram observadas diferenças de migração para os isolados 30 e 271 e, no quarto fragmento (CtERGr4), dois padrões de migração foram observados entre todos os isolados de *C. tropicalis*.

Figura 3 – Gel de poliacrilamida a 6% mostrando padrões de migração diferenciados dos isolados 45170 e da cepa ATCC, após eletroforese SSCP do segundo fragmento de *C. tropicalis* (CtERGr2)

O único fragmento do gene ERG11 do complexo *C. parapsilosis* (CpERG), apresentou 3 padrões de migração bem definidos. O primeiro padrão sendo representado pelos isolados 44, 68 e a cepa ATCC 22019; o segundo pelos isolados 51, 59, 100, 366 e 400; e o terceiro por 22, 23 e 57 (**Figura 4**).

Figura 4 – Gel de poliacrilamida a 6% mostrando os três padrões de mobilidade eletroforética obtidos por SSCP, do único fragmento amplificado do complexo *C. parapsilosis* (CpERG)

Para o primeiro fragmento do gene ERG11 de *C. glabrata*, não houve diferença de mobilidade em nenhum dos seis isolados; porém, para os outros três fragmentos, foi possível observar diferenças no padrão eletroforético de pelo menos um isolado por fragmento.

Para todos os isolados de *C. krusei*, não houve diferença nos padrões de migração para os quatro fragmentos analisados.

5.4 Análise dos amplificadores do gene ERG11 das cinco espécies de *Candida* por seqüenciamento automatizado

Todos os isolados de *Candida* que apresentaram padrões diferenciados na migração de bandas pela SSCP foram selecionados para o seqüenciamento automatizado. Entretanto, para reduzir os riscos de perda de dados devido aos possíveis resultados falso-negativos gerados pela técnica de SSCP (mesmo com a presença de alterações na sequência, a migração eletroforética não apresentaria diferença), todos os fragmentos dos 87 isolados de *Candida* que apresentaram redução da susceptibilidade ao fluconazol ($MIC \geq 16 \mu g/ml$), foram selecionados para o seqüenciamento, bem como as cepas de referência empregadas nos testes de susceptibilidade. Foram também submetidos às reações de seqüenciamento três isolados, selecionados de forma aleatória por meio de análise computadorizada (www.random.org; Beller *et al.*, 2002), entre aqueles cujos fragmentos amplificados não apresentaram diferença na migração eletroforética.

Deste modo, 53 dos 87 (60,92%) isolados foram selecionados e submetidos ao seqüenciamento, compreendendo um total de 109 fragmentos.

A extensão seqüenciada do gene ERG11 foi de 1451pb para *C. albicans*, 1662pb para *C. glabrata*, 1647pb para *C. krusei*, 1680pb para *C. tropicalis* e 427pb para o complexo *C. parapsilosis*.

Não foi possível analisar as seqüências referentes ao fragmento único dos três isolados de *C. orthopsilosis*, pois os eletroferogramas obtidos após seqüenciamento apresentaram diversas sobreposições de picos.

No total, foram identificadas 217 alterações nucleotídicas. Destas, 157 encontradas na espécie *C. albicans*, 47 em *C. tropicalis*, seis em *C. glabrata*, quatro em *C. parapsilosis sensu stricto* e três em *C. krusei* (**Figura 5**). Quanto à natureza dessas alterações, 185 (85,3%) foram identificadas como mutações silenciosas (que não alteram o aminoácido traduzido) e 32 (14,7%) como mutações de sentido trocado (alteram a tradução do códon de um aminoácido para outro). Não foram encontradas inserções e/ou deleções, assim como mutações sem sentido (que codificam um códon de parada ao invés de um aminoácido).

Dentre todos os fragmentos seqüenciados, o segundo de *C. tropicalis* (CtERGr2) foi o que apresentou a maior freqüência de alterações nucleotídicas, com média de 6 alterações por seqüência. Por outro lado, não foram encontradas alterações no primeiro fragmento de *C. tropicalis* (CtERGr1) e *C. glabrata* (CgERGr1), e segundo e terceiro de *C. krusei*

(CkERGr2 e CkERGr3). Os demais fragmentos apresentaram frequências intermediárias (**Tabela 3**).

Figura 5 – Número de mutações encontradas no gene ERG11 de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. tropicalis*, dispostas de acordo com o tipo de mutação.

Tabela 3 – Número e tipo de mutação encontrados após sequenciamento dos 109 fragmentos do gene ERG11, das cinco espécies de *Candida*

Fragmentos	Sequenciados	Silenciosas	Sentido trocado	Total	Média*
(Ca)ERGSec1	9	19	7	26	2,89
(Ca)ERGSec2	10	17	5	22	2,2
(Ca)ERGSec3	32	101	8	109	3,41
CgERGr1	5	0	0	0	0
CgERGr2	5	3	0	3	0,6
CgERGr3	5	2	0	2	0,4
CgERGr4	5	1	0	1	0,2
CkERGr1	4	0	1	1	0,25
CkERGr2	4	0	0	0	0
CkERGr3	4	0	0	0	0
CkERGr4	4	2	0	2	0,5
CpERG	3	2	2	4	1,33
CtERGr1	3	0	0	0	0
CtERGr2	4	22	2	24	6
CtERGr3	6	15	7	22	3,67
CtERGr4	6	1	0	1	0,17
Total	109	185	32	217	1,99

* média de mutações encontradas por fragmento sequenciado

5.4.1 Mutações silenciosas

Foram identificadas 185 mutações silenciosas nos 109 fragmentos do gene ERG11 analisados. Em *C. albicans*, as mais freqüentes encontram-se nos resíduos L480, N490, Y401 e L370 com 19, 16, 15 e 14 ocorrências, respectivamente, tanto nos isolados sensíveis quanto nos resistentes. O número de mutações silenciosas encontrado para cada isolado de *C. albicans* está indicado na **Tabela 7**.

O alinhamento entre as seqüências depositadas no *GenBank* para *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* com aquelas obtidas no estudo, permitiu a

identificação de dois nucleotídeos polimórficos para as duas primeiras espécies (**Tabelas 4 e 5**), e cinco para *C. tropicalis* (**Tabela 6**).

Com exceção dos resíduos 88 e 454 de *C. tropicalis*, nos quais a variação nucleotídica se deu entre duas purinas (A e G), os outros sítios polimórficos apresentaram variação entre pirimidinas (T e C), com a presença de heterozigose em ambos os casos.

Tabela 4 – Polimorfismos encontrados nas seqüências nucleotídicas do gene ERG11 de *C. krusei*, disponíveis no *GenBank* e identificados nos isolados do estudo

Acesso ^a / Isolados do estudo ^b	Codons	
	214	463
EU309501 ^a	AAY	TCY
EU309499 ^a	AAY	TCY
EU309502 ^a	AAY	TCY
EU296427 ^a	AAT	TCC
EU309500 ^a	AAY	TCY
EU296426 ^a	AAC	TCC
EU296425 ^a	AAC	TCT
AF531428 ^a	AAC	TCT
115/03 ^b	AAY	TCY
183/H/06 ^b	AAT	TCC
03-296-01 ^b	AAY	TCY
ATCC 6258 ^b	AAT	TCC

^a números de acesso do *GenBank*

Y = C ou T

Tabela 5 – Polimorfismos encontrados nas seqüências nucleotídicas do gene ERG11 de *C. glabrata*, disponíveis no *GenBank* e identificados nos isolados do estudo

Acesso ^a / Isolados do estudo ^b	Codons	
	278	425
DQ060157 ^a	GAT	AAT
AY942647 ^a	GAT	AAC
EU219979 ^a	GAC	AAT
EU219981 ^a	GAC	AAT
EU219980 ^a	GAC	AAC
L40389 ^a	GAT	AAT
FJ167409 ^a	GAC	AAC
80SP3/06 ^b	GAC	AAC
81SP3/06 ^b	GAT	AAT
174H/06 ^b	GAC	AAC
435H/06 ^b	GAT	AAC
ATCC 90030 ^b	GAT	AAT

^a números de acesso do *GenBank* Y = C ou T

Tabela 6 – Polimorfismos encontrados nas seqüências nucleotídicas do gene ERG11 de *C. tropicalis*, disponíveis no *GenBank* e identificados nos isolados do estudo

Acesso ^a / Isolados do estudo ^b	Codons				
	75	88	261	454	518
AY942645 ^a	TGC	TTA	ATC	AAA	ATC
AY942643 ^a	TGC	TTA	ATC	AAG	ATT
AY942646 ^a	TGT	TTG	ATT	AAG	ATT
AY942644 ^a	TGT	TTG	ATT	AAG	ATT
030/05 ^b	-	-	-	AAA	ATC
091/02 ^b	TGC	TTA	ATT	AAR	ATC
145/02 ^b	TGT	TTG	-	AAG	ATT
147-SP3/06 ^b	-	-	-	AAG	ATT
01-45170-01 ^b	-	-	ATY	AAG	ATT
ATCC 200956 ^b	TGT	TTA	ATT	AAA	ATC

^a números de acesso do *GenBank* Y = C ou T

5.4.2. Mutações de sentido trocado

As mutações de sentido trocado foram encontradas em 19 dos 53 isolados (35,8%) seqüenciados. A relação das mutações de sentido trocado com as respectivas identificações dos isolados de *Candida* spp. e com os testes de susceptibilidade ao fluconazol, encontram-se descritos na **Tabela 7**.

As 32 mutações encontradas neste estudo foram detectadas tanto em homozigotia como em heterozigose (**Figura 6**). No total, 10/32 (31,3%) das mutações de sentido trocado foram encontradas em ambos os alelos e 22/32 (68,7%) em apenas um deles.

Figura 6 – Mutação D116E identificada em homozigose (A) e em heterozigose (B), no gene ERG11 de *C. albicans* (isolados 06/05 e ATCC64550)

As mutações de sentido trocado foram identificadas em 17 resíduos distintos: 11 resíduos em *C. albicans* (20 mutações; **Figura 7**); quatro em *C. tropicalis* (nove mutações; **Figura 8**); em um resíduo de *C. krusei* (uma mutação), e de *C. parapsilosis* (duas mutações).

Figura 7 – Mutações de sentido trocado identificadas no gene ERG11 de isolados de *C. albicans* do estudo.

Figura 8 – Mutações de sentido trocado identificadas no gene ERG11 de isolados de *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* do estudo.

Dentre os nove isolados de *C. albicans* com redução da susceptibilidade ao fluconazol, sete (7/9) apresentaram mutações de sentido trocado: no isolado 006/05 foram identificadas cinco destas mutações; nos isolados 036/05, 193/02 e na cepa ATCC 64550 (padrão de resistência) foram identificadas duas mutações, enquanto em 012/05, 016/05 e 149/02 apenas uma mutação de sentido trocado. O isolado 125/03 apresentou somente mutações silenciosas (seis) e 148/02 foi o único que apresentou a seqüência nucleotídica selvagem (**Tabela 7**).

Por outro lado, dos 23 isolados de *C. albicans* sensíveis que tiveram apenas o fragmento 3 do gene ERG11 sequenciado (por apresentar diferenças na migração por SSCP), cinco (21,7%) apresentaram mutações de sentido trocado, sendo apenas uma mutação por isolado, com exceção do isolado 130/03 que apresentou duas mutações (**E266D** e **V437I**; **Tabela 7**).

As mutações **D116E**, **K128T**, **E266D**, **S405F** e **V437I** foram as mais freqüentes em *C. albicans* com 3/20 (15%), 2/20 (10%), 3/20 (15%), 2/20 (10%) e 4/20 (20%) respectivamente, representando juntas, 70% das mutações de sentido trocado encontradas nesta espécie (**Figura 7**). Estas mutações foram encontradas em 10 isolados distintos, sendo seis sensíveis, dois susceptíveis dose-dependentes e dois resistentes (**Tabela 7**).

Nos resíduos **V362** e **K344** do isolado de *C. tropicalis* 01-45170-01 (sensível ao fluconazol) e da cepa ATCC 200956 (susceptível dose-dependente), foram identificadas duas mutações, ocorrendo simultaneamente no mesmo códon. Na posição 362 foi observada uma troca

de uma guanina por uma adenina na posição 1084, e uma timina por uma guanina na posição 1086, resultando na troca de uma valina na posição 362 por uma metionina; enquanto na posição K344 uma adenina foi substituída por uma citosina na posição 1031, com a troca de uma lisina por uma treonina; e a substituição de uma guanina por uma citosina na posição 1032 que, no entanto, não alterou o aminoácido resultante (**Tabela 7**).

Para os isolados de *C. krusei* e *C. parapsilosis sensu stricto* foi encontrada apenas uma mutação para cada espécie: **K53M** (183H/06) e **R398I**, respectivamente, sendo esta última observada em dois isolados distintos (51 e 59).

Não foram identificadas mutações de sentido trocado nos isolados de *C. glabrata*. Os três isolados de *C. orthopsilosis* geraram resultados de seqüenciamento inconclusivos.

Tabela 7 – Sítio de isolamento, resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* ao fluconazol e mutações encontradas no gene ERG11 dos 87 isolados clínicos de *Candida* e cepas ATCC.

ID	Sítio de isolamento	Espécie	MIC (µg/ml)	Fragmentos seqüenciados	Mutações de sentido trocado	Mutações silenciosas
006/05	Cavidade oral	<i>C. albicans</i>	32	1, 2 e 3	A61A/V, D116D/E, E266E/D, S279F, V437V/I	14
012/05	Orofaringe	<i>C. albicans</i>	64	1, 2 e 3	R467I	9
01-34405-01	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,12	3	-	1
01-34411-01	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	3
01-34415-01	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	4
01-34424-01	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	V437V/I	4
01-34428-01	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	4
016/05	Cavidade oral	<i>C. albicans</i>	32	1, 2 e 3	Y132F	6
025/05	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,12	3	-	3
026/05	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	3
036/05	Urina	<i>C. albicans</i>	64	1, 2 e 3	D116D/E, K128K/T	8
041/05	Urina	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	3
045/05	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,12	3	-	3
057/03	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	3
070/02	Sangue	<i>C. albicans</i>	2	3	-	3
074/02	Sangue	<i>C. albicans</i>	2	3	V437V/I	3
091/03	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	3
104/03	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	3
111/03	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	3
125/03	Sangue	<i>C. albicans</i>	16	1, 2 e 3	-	6
130/03	Sangue	<i>C. albicans</i>	1	2 e 3	E266E/D, V437V/I	6
138/03	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	3
147/03	Sangue	<i>C. albicans</i>	2	3	-	3
148/02	Sangue	<i>C. albicans</i>	16	1, 2 e 3	-	-
149/02	Sangue	<i>C. albicans</i>	64	1, 2 e 3	L321L/F	-
193/02	Sangue	<i>C. albicans</i>	64	1, 2 e 3	E266D, V488V/I	9
290/02	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	9
291/02	Não consta	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	4
62010/08	Biópsia de esôfago	<i>C. albicans</i>	0,25	3	S405F	-
66786/08	Sangue	<i>C. albicans</i>	0,5	3	S405F	3
72118/08	Esôfago	<i>C. albicans</i>	0,25	3	-	4

Continua

ID	Sítio de isolamento	Espécie	MIC (µg/ml)	Fragmentos sequenciados	Mutações de sentido trocado	Mutações silenciosas
ATCC 64550	-	<i>C. albicans</i>	16	1, 2 e 3	D116E, K128T	5
014/05	Orofaringe	<i>C. glabrata</i>	4	1, 2, 3 e 4	-	-
174H/06	Sangue	<i>C. glabrata</i>	16	1, 2, 3 e 4	-	1
435H/06	Sangue	<i>C. glabrata</i>	16	1, 2, 3 e 4	-	2
80SP3/06	Sangue	<i>C. glabrata</i>	8	1, 2, 3 e 4	-	1
81SP3/06	Sangue	<i>C. glabrata</i>	4	1, 2, 3 e 4	-	1
ATCC 90030	-	<i>C. glabrata</i>	8	1, 2, 3 e 4	-	1
03-296-01	Sangue	<i>C. krusei</i>	32	1, 2, 3 e 4	-	1
115/03	Sangue	<i>C. krusei</i>	32	1, 2, 3 e 4	-	1
183H/06	Sangue	<i>C. krusei</i>	16	1, 2, 3 e 4	K53K/M	-
ATCC 6258	-	<i>C. krusei</i>	32	1, 2, 3 e 4	-	-
57	Sangue	<i>C. orthopsilosis</i>	0,12	1	NC	NC
022/05	Sangue	<i>C. orthopsilosis</i>	0,25	NS	NS	NS
023/05	Sangue	<i>C. orthopsilosis</i>	0,25	1	NC	NC
44	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>	0,12	1	-	-
51	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	1	R398I	1
59	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>	0,12	1	R398I	1
100	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	NS	NS	NS
366	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	NS	NS	NS
400	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>	0,12	NS	NS	NS
068/06	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	NS	NS	NS
ATCC 22019	-	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	NS	NS	NS
01-34262-01	Urina	<i>C. tropicalis</i>	0,25	NS	NS	NS
01-34398-01	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
01-34418-01	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
01-41933-01	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
01-41998-02	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	2	NS	NS	NS
01-45017-01	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,25	NS	NS	NS
01-45170-01	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	2, 3 e 4	K344K/T, V362V/M, Y221Y/F, R371R/S.	16
01-45253-01	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS

Continua

ID	Sítio de isolamento	Espécie	MIC (µg/ml)	Fragmentos sequenciados	Mutações de sentido trocado	Mutações silenciosas
030/05	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	2	3 e 4	K344K/T	5
032H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
057-SP3/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
091/02	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	8	1, 2 e 4	-	1
097H/03	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
097H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,12	NS	NS	NS
109SP3/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	2	NS	NS	NS
142H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
145/02	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	64	1, 2 e 4	-	1
147-SP3/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	2	4	-	-
156H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	2	NS	NS	NS
172-SP3/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
181H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	2	NS	NS	NS
190H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	2	NS	NS	NS
194-SP3/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
204H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,25	NS	NS	NS
205H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,12	NS	NS	NS
220-SP3/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
227-SP3/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
231-SP3/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,25	NS	NS	NS
271H/05	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	3	K344K/T	4
286H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	0,5	NS	NS	NS
295-SP3/06	Urina	<i>C. tropicalis</i>	0,25	NS	NS	NS
311H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	2	NS	NS	NS
312H/06	Sangue	<i>C. tropicalis</i>	2	NS	NS	NS
ATCC 200956	-	<i>C. tropicalis</i>	16	1, 2, 3 e 4	Y221Y/F, K344K/T, V362V/M	11

ID = identificação

MIC = concentração inibitória mínima

NS = não sequenciado

NC = sequenciamento não conclusivo

6. DISCUSSÃO

Os medicamentos da classe dos triazólicos, particularmente o fluconazol, são amplamente empregados na terapêutica das candidíases pela elevada eficácia e baixa toxicidade. No entanto, o uso prolongado do medicamento em esquemas terapêuticos e profiláticos, bem como seu uso repetitivo devido à recorrência de infecções em indivíduos imunossuprimidos, podem propiciar o desenvolvimento de resistência durante o tratamento, culminando com a seleção de linhagens resistentes ou de espécies intrinsecamente resistentes, nos casos de infecções causadas por mais de uma espécie de *Candida* (White *et al.*, 1998; Cowen *et al.*, 2000).

A elucidação dos mecanismos moleculares que acarretam o desenvolvimento de resistência aos triazólicos pode contribuir para a prevenção deste fenômeno, seja através do emprego de terapêuticas combinadas ou pelo desenvolvimento de novos fármacos.

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de identificar alterações nucleotídicas presentes no gene ERG11 de isolados de *Candida* spp. e verificar a existência de associação entre estas alterações e a resistência *in vitro* ao fluconazol.

6.1 Identificação molecular dos isolados do estudo

A amplificação da região ITS do DNAr dos 87 isolados clínicos de *Candida* spp. avaliados no estudo, mostraram 100% de concordância com as identificações microbiológicas.

Como demonstrado por alguns autores (Tavanti *et al.* 2005; Gomez-Lopez *et al.*, 2008; Asadzadeh *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010), a região ITS do DNA ribossomal de *Candida* possui grande variação em sua sequência nucleotídica, permitindo a distinção entre as espécies, inclusive as pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*. O alinhamento das sequências obtidas após amplificação com os *primers* ITS1 e ITS4 dos 11 isolados do estudo, com as sequências de referência disponíveis no *GenBank*, identificou sete deles e a cepa ATCC 22019 como *C. parapsilosis sensu stricto*, e três isolados como *C. orthopsilosis*, com valores de identidade iguais ou maiores a 99% (**Anexos A-J**); neste grupo não foram identificados isolados de *C. metapsilosis*. De fato, esta espécie tem sido descrita por alguns autores como a menos prevalente do complexo *C. parapsilosis* (Lockhart *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010).

No Brasil, Gonçalves e colaboradores (2010), em estudo multicêntrico realizado no ano de 2009 em 11 hospitais de nove cidades do país, avaliaram a prevalência das três espécies em 141 isolados pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*. A espécie *C. metapsilosis* foi relatada como a menos prevalente, representando apenas 3% do total de isolados; *C.*

parapsilosis sensu stricto e *C. orthopsilosis* representaram, respectivamente, 88 e 9% dos isolados avaliados.

6.2 Amplificações dos fragmentos do gene ERG11 com os primers delineados no estudo

Delineados neste estudo, os *primers* (com exceção daqueles utilizados para *C. albicans*) revelaram-se adequados para as amplificações dos fragmentos do gene ERG11 de *Candida*. Os amplificados analisados por eletroforese em géis de agarose a 2% resultaram em bandas únicas e específicas para cada espécie de *Candida*, com pesos moleculares correspondentes aos pares de bases estimados pelas ferramentas empregadas no delineamento.

6.3 Análise por eletroforese SSCP dos amplificados de ERG11

Apesar das reações de seqüenciamento estarem cada vez mais acessíveis graças à diminuição dos custos, os valores ainda não permitem seu emprego de forma sistemática. Com o objetivo de reduzir os custos do projeto, a técnica de eletroforese SSCP foi avaliada neste estudo como método de triagem de mutações no gene ERG11, para que os seqüenciamentos fossem realizados somente para os amplificados que apresentassem diferenças de migração. Sendo assim, o gene ERG11 foi

dividido em fragmentos para que os pesos moleculares dos amplificadores fossem adequados às análises por SSCP, a exemplo do que já havia sido feito em outros estudos, nos quais a sequência do gene ERG11 foi dividida em dois ou três fragmentos, com sobreposição de nucleotídeos variando entre 25 e 50 pares de bases (Asai, 1999; Chau *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008).

No entanto, confrontando os resultados obtidos pelas duas técnicas, não foi observada relação entre os padrões diferenciados de migração eletroforética, o número e natureza das mutações identificadas por sequenciamento, nos mesmos amplificadores.

Wang e colaboradores, em 2008, utilizaram com sucesso a técnica de SSCP para diferenciação de espécies de *Candida* e *Saccharomyces*, após amplificação por PCR da região ITS1/ITS2 do DNA ribossomal. Os autores relatam que a técnica apresentou sensibilidade relativamente elevada para a detecção de mutações de apenas uma única base em sequências com no máximo 200 pares de base, mas que o poder de discriminação decresceu consideravelmente à medida que o peso molecular do fragmento aumentou, notadamente para sequências com mais de 400 pares de base. Esta seria uma possível explicação para o baixo poder discriminatório da técnica de SSCP neste estudo, uma vez que a maior parte dos fragmentos analisados apresentava mais de 400 pares de base.

Muitos amplificadores apresentaram o mesmo padrão de migração eletroforética e, no entanto, revelaram presença de mutações tanto silenciosas quanto com troca de aminoácido (**Figura 9**). Por outro lado, o terceiro fragmento de *C. albicans* (ERGsec3), no qual foram observados

diversos padrões de migração na SSCP, foi encontrada a maior frequência de mutações (**Figura 2**).

Em relação ao complexo *C. parapsilosis*, o isolado 57, identificado como *C. orthopsilosis*, apresentou padrão diferenciado de migração eletroforética em SSCP (**Figura 4**). Os outros dois isolados da espécie (022/05, 023/05) também apresentaram o mesmo padrão de migração, diferente do observado para os amplificados de *C. parapsilosis sensu stricto* (dados não apresentados). Este fato poderia indicar diferenças na composição do gene ERG11 entre as espécies do complexo *C. parapsilosis*.

Figura 9 – Géis de SSCP a 6% mostrando os amplificados do primeiro fragmento de *C. albicans* (A) e quarto fragmento de *C. tropicalis* (B) destacando as mutações de sentido trocado e silenciosas (entre colchetes) identificadas por seqüenciamento automatizado.

Diaz-Lopes e colaboradores, em 2004, avaliaram a técnica de SSCP para o gene ERG11 de 32 isolados de *C. albicans*, com diferentes resultados de susceptibilidade aos antifúngicos. Os autores identificaram três diferentes padrões de migração entre os isolados sem, no entanto, observar correlação com os resultados de susceptibilidade.

Em estudo realizado por Liu e colaboradores em 2008, a técnica de SSCP foi empregada na análise de 89 isolados de *C. albicans* provenientes de pacientes com candidíase vulvovaginal, para investigar a relação entre os diferentes genótipos observados por eletroforese SSCP de microssatélites e resultados de susceptibilidade aos antifúngicos. Comparando-se os padrões de migração de isolados resistentes e susceptíveis, os autores observaram que um dos genótipos encontrados foi dominante em isolados resistentes ao itraconazol. No entanto, para os demais azólicos, não foi possível correlacionar os genótipos a resistência ou susceptibilidade.

Os achados desses autores parecem corroborar os resultados do presente estudo, demonstrando que a técnica de SSCP não é adequada para a análise de alterações nas sequências nucleotídicas do gene *ERG11*.

6.4 Mutações silenciosas

Na década de 1980, estudos já demonstravam que mutações silenciosas também podem afetar a produção de proteínas em bactérias e fungos. Uma descoberta chave foi que os genes desses organismos não usam códons sinônimos (códon selvagem e códon contendo mutação silenciosa) em igual número (Gouy e Gautier, 1982). A seleção de um dos códons sinônimos não é aleatória, e alguns são mais frequentemente utilizados (Duret, 2002). O motivo para esta utilização diferenciada é que

certos códons aumentam a velocidade ou precisão da síntese protéica (Bonekamp *et al.*, 1989).

Mutações silenciosas podem alterar a forma como o *splicing* (maturação do RNA mensageiro) vai ocorrer. Este mecanismo baseia-se no fato de que os exons não têm a função única de codificar aminoácidos, mas também ajudam na remoção dos introns. Nas junções intron/exon, existem de 3 a 8 nucleotídeos (estimuladores de introns exônicos) que sinalizam a quebra ou a permanência da ligação. Mutações silenciosas nos códons contendo esses estimuladores, embora não alterem o aminoácido, podem exercer grande efeito sobre a proteína, simplesmente por interromperem a remoção adequada dos íntrons (Wang e Cooper, 2007).

Essas mutações também podem afetar o dobramento da molécula de RNA mensageiro, pois um nucleotídeo diferente afeta a conformação, mesmo que o intron seja removido corretamente. O modo como a molécula se dobra determina sua estabilidade, afetando a velocidade de tradução (Nackley *et al.*, 2006).

No presente estudo, foram identificadas 185 mutações silenciosas, destacando-se quatro resíduos (L480, N490, Y401 e L370) com elevado número de ocorrências em isolados de *C. albicans*.

Nas espécies *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, foram observadas respectivamente, duas (códon 214 e 463), duas (códon 278 e 425) e cinco (códon 75, 88, 261, 454, 518) regiões polimórficas, conforme descritas nas **Tabelas 4, 5 e 6**. Estes polimorfismos, presentes em isolados susceptíveis e resistentes, não alteram os aminoácidos resultantes, sugerindo que são

funcionalmente silenciosos e possivelmente não relacionados à susceptibilidade aos antifúngicos.

Polimorfismos no gene *ERG11* de *C. krusei* e *C. tropicalis* não foram descritos até o momento, talvez pelo fato de existirem poucos estudos que avaliem mutações do gene nestas espécies.

Em estudo realizado por Brun e colaboradores (2004), e por Berila e colaboradores (2010) foram identificadas, respectivamente, seis e quatro regiões polimórficas no gene *ERG11* de *C. glabrata*. No entanto, ambos os estudos não inferiram nenhum tipo de relação com susceptibilidade aos antifúngicos.

Esses polimorfismos demonstram a diversidade genética dos isolados clínicos de *Candida* em ambientes hospitalares e podem ser úteis para análises de genótipos e estudos evolutivos de linhagens resistentes a antifúngicos (Coste *et al.*, 2007).

As mutações silenciosas identificadas no presente estudo estavam distribuídas aleatoriamente entre isolados de *Candida* spp. susceptíveis e resistentes ao fluconazol. Entretanto, apesar de que muitos isolados susceptíveis do estudo não terem sido seqüenciados, o maior número de ocorrências destas mutações foi encontrado em isolados resistentes (**Tabela 7**). Assim, este fato parece indicar que estes últimos estariam sofrendo alguma pressão seletiva; o acúmulo de mutações silenciosas em um mesmo códon poderia resultar, em algum momento, na tradução de um novo aminoácido.

6.5 Mutações de sentido trocado

Mutações na sequência do gene *ERG11*, acarretando substituições de aminoácidos, representam um dos principais mecanismos que contribuem para a resistência aos azóis em isolados clínicos de *Candida*. Na literatura, até o presente, mais de 140 diferentes mutações de sentido trocado foram relatadas em isolados de *C. albicans*, mas apenas algumas destas foram comprovadamente associadas à resistência a antifúngicos (Morio *et al.*, 2010).

Estudo de Marichal e colaboradores (1999) demonstrou que cinco mutações se destacaram como as mais freqüentes. Dentre elas, quatro foram identificadas no presente estudo (**D116E**, **K128T**, **E266D** e **S405F**), ocorrendo com maior frequência nos isolados de *C. albicans*; no entanto, a mutação **G464S**, relatada como a segunda mais frequente, não foi identificada em nenhum dos isolados seqüenciados. Em contraste, a mutação **V437I**, citada como de baixa freqüência por esses mesmos autores, foi a que apresentou maior número de ocorrências nos isolados de *C. albicans* do estudo (**Figura 10**).

Figura 10 – Comparação entre a frequência de mutações encontradas no gene ERG11 de *C. albicans* por Marichal *et al.*, 1999 (A) e número de ocorrências de mutações encontradas neste estudo (B).

Em estudo realizado por Goldman e colaboradores em 2004, único realizado no Brasil sobre mutações no gene ERG11 de *Candida* publicado até o momento, também não foi encontrada a mutação **G464S** em 20 isolados de *C. albicans* avaliados. Estes dados indicam que as diferenças podem estar relacionadas à baixa taxa de fluxo gênico, gerando estabilidade genética, além de sugerir que não ocorram trocas entre regiões muito distantes em termos geográficos.

Algumas das mutações encontradas neste estudo já foram descritas previamente, e conferem redução na susceptibilidade ao fluconazol. A alteração de uma alanina por uma valina na posição 61 (**A61V**) identificada

no isolado de *C. albicans* 006/05, foi descrita por Chau e colaboradores (2004), que demonstraram conferir resistência quando presente sob forma isolada ou associada às mutações **Y257H**, **G464S** e **G307S** em *Saccharomyces cerevisiae*. No mesmo estudo, ficou demonstrado experimentalmente, que as mutações **D116E** e **K128T**, também descritas por outros autores (Sanglard *et al.*, 1998; Favre *et al.*, 1999; Marichal *et al.*, 1999; Perea *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2008), não conferiram nenhum grau de resistência. No presente estudo, as mutações **D116E** e **K128T** foram identificadas, combinadas entre si, porém sem associação com outras mutações, no isolado *C. albicans* 36/05 e na cepa ATCC 64550, que apresentaram resistência ao fluconazol. A redução da sensibilidade ao antifúngico poderia, neste caso, estar associada à atuação de outros mecanismos de resistência que estariam ocorrendo concomitantemente.

As mutações **E266D**, **V437I** e **V488I** identificadas neste estudo em *C. albicans*, também foram descritas por outros autores e são encontradas tanto em isolados resistentes como em susceptíveis, não apresentando associação direta com o desenvolvimento de resistência (Favre *et al.*, 1999; Perea *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008; Morio *et al.*, 2010). Por outro lado, as alterações **Y132F** e **S405F** foram encontradas em modelos experimentais, e estavam associadas ao aumento de quatro vezes nos valores de MIC ao fluconazol, apresentando ainda efeito cumulativo quando em combinação (Sanglard *et al.*, 1998; Favre *et al.*, 1999; Perea *et al.*, 2001; Chau *et al.*, 2004).

No presente estudo, a mutação **Y132F** foi identificada no isolado de *C. albicans* 016/05, susceptível dose-dependente ao fluconazol (MIC 32µg/ml), enquanto a mutação **S405F** foi identificada em homozigose em dois isolados susceptíveis de *C. albicans*: 62010/08 e 66786/08. Entretanto, este tipo de discordância tem sido citado na literatura para a mutação **Y132H** (Sanglard *et al.*, 1998; Bellamine *et al.*, 2004) e recentemente, Morio e colaboradores (2010) identificaram a alteração **G464S** (mutação que confere resistência) em três isolados de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol.

As mutações **S279F** e **R467I** têm sido encontradas apenas em isolados de *C. albicans* resistentes, porém, sempre em combinação com outras alterações, podendo conferir um aumento de até oito vezes nos valores de MIC para o fluconazol (Marichal *et al.*, 1999; Chau *et al.*, 2004). Entretanto, no presente estudo, a mutação **R467I** foi identificada no isolado 012/05 de *C. albicans*, com valor de MIC igual a 64µg/ml, sem associação a outras mutações de sentido trocado. Assim, é possível que a mutação isoladamente possa conferir resistência; a hipótese torna-se ainda mais plausível levando-se em conta que uma mutação no mesmo códon (**R467K**), obtida experimentalmente em *C. albicans*, confere resistência, sendo responsável por um aumento de quatro vezes nos valores de MIC para o fluconazol (White, 1997; Sanglard *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004).

A mutação **L321F**, identificada em heterozigose no isolado de *C. albicans* 149/02, não foi relatada na literatura até o momento. Trata-se de uma transversão de uma adenina (purina) para uma citosina (pirimidina) na

posição 963 do gene ERG11. Esta mutação foi encontrada sem associação com outras mutações, incluindo as silenciosas, e o isolado apresentou resistência *in vitro*, com valor de MIC igual a 64µg/ml. Estes aminoácidos possuem propriedades físicas distintas: a lisina é um aminoácido com cadeia lateral muito polar, o que a torna altamente hidrofílica; enquanto, a fenilalanina é fortemente hidrofóbica. A forma como os aminoácidos interagem com a água é um fator importante na estabilidade da proteína, tendo um papel relevante em seu enovelamento (Berezovsky e Trifonov, 2001).

Embora a ERG11p (14DM) de *Candida* spp. não tenha sido analisada por cristalografia, um modelo da estrutura tridimensional da ERG11p de *C. albicans* foi elaborado por Ji e colaboradores em 2008, com base em análises cristalográficas de quatro 14DM de procariotos, utilizando ferramentas de bioinformática. Os autores avaliaram, no modelo hipotético, a interação da molécula 14DM com antifúngicos da classe dos azólicos, particularmente o fluconazol e itraconazol, demonstrando que o anel fenólico halogenado dos azólicos se liga à região muito próxima ao resíduo Y132, devendo ocorrer interação entre eles.

No presente estudo, foi elaborado um modelo teórico homólogo, baseado na estrutura cristalina da 14DM de *Mycobacterium tuberculosis*, através do *software* 3D-jigsaw (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>; Bates e Sternberg, 1999; Bates *et al.*, 2001; Contreras-Moreira e Bates, 2002). Este programa utiliza o método de modelagem por homologia, que se baseia na suposição de que duas proteínas homólogas compartilham

estruturas muito semelhantes; assim, uma sequência alvo pode ser modelada com razoável precisão em modelos evolutivamente distantes (Chothia e Lesk, 1986; Zhang e Skolnick, 2005).

Com o auxílio do *software* Rasmol 2.7.5 (<http://rasmol.org/>) foi possível visualizar a estrutura tridimensional da proteína e determinar a localização aproximada da mutação **L321F** na molécula (**Figuras 11A e 11B**). De acordo com o modelo, esta mutação estaria localizada na hélice central da molécula, região descrita por alguns autores como próxima ao sítio de ligação dos azólicos e associada ao desenvolvimento de resistência (Ji *et al.*, 2000; Fukuoka *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004).

Em estudo realizado por Lamb e colaboradores (1997), uma mutação na posição 315, localizada no centro ativo da ERG11p e prevista por modelagem molecular, foi clonada em *S. cerevisiae*. A mutação (**T315A**) reduziu em quatro a cinco vezes a afinidade da enzima ao fluconazol; no entanto, até o momento, esta mutação não foi encontrada em isolados clínicos de *C. albicans*.

A alteração **T315A** foi inserida no modelo teórico elaborado no presente estudo, sendo possível observar que também está localizada na hélice central da proteína (**Figuras 11A e 11B**). Esta proximidade pode ser um indício de que a mutação **L321F** possa estar envolvida no desenvolvimento de resistência ao fluconazol.

Figura 11 – Visualização da predição da estrutura tridimensional da enzima ERG11p (14DM) de *C. albicans* (3d-jigsaw) utilizando o software Rasmol 2.7.5. Visão frontal (A) e lateral (B) da enzima, destacando em vermelho a localização da mutação **L321F** encontrada no estudo, e em verde a mutação **T315A** avaliada no estudo de Lamb *et al.* (1997).

Assim como **L321F**, as mutações **Y221F** (A662T), **K344T** (A1031C), **V362M** (G1084A e T1086G) e **R371S** (A1113C) identificadas em heterozigose em alguns isolados de *C. tropicalis* (30/05, 271H/05, 45170-01 e cepa ATCC 200956 – **Tabela 7**) também não foram descritas na literatura até o momento. Tais mutações parecem não estar relacionadas com a susceptibilidade desta espécie ao fluconazol, uma vez que foram encontradas associadas, em isolados susceptíveis. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que, em combinação, estas mutações possam desenvolver sistemas compensatórios, onde a presença de uma ou mais

delas, anulem ou reduzam a resistência conferida pelas outras (Marichal *et al.*, 1999).

Há, até o momento, apenas dois estudos disponíveis na literatura sobre mutações no gene *ERG11* de *C. tropicalis* (Loëffler *et al.*, 2000; Vandeputte *et al.*, 2005). Apenas neste último foi identificada uma mutação de sentido trocado (**Y132F**) em um isolado resistente. Esta mutação já havia sido descrita em *C. albicans* anteriormente por diversos autores, com envolvimento na resistência aos azólicos (Sanglard *et al.*, 1998; Chau *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2004).

Do mesmo modo que para *C. albicans* e *C. tropicalis*, também foi identificada uma mutação ainda não descrita na literatura, a **K53M** (A158T), em um dos quatro isolados de *C. krusei* analisados (183H/06), cujo valor de MIC (16µg/mL) foi o menor quando comparado aos outros três. No único estudo publicado até o momento, em que foram avaliadas mutações no gene *ERG11* desta espécie, foram identificadas duas mutações (**D434A** e **K456R**). Os autores apontam a composição da sequência selvagem da *ERG11p* de *C. krusei* como o principal fator responsável pela resistência desta espécie aos compostos azólicos, uma vez que a diferente conformação da molécula, reduz a afinidade com estes fármacos (Fukuoka *et al.*, 2002).

Ocorrendo em dois isolados distintos (51 e 59), a mutação **R398I**, resultante da troca de uma guanina por uma timina na posição 1193, foi a única mutação de sentido trocado identificada no gene *ERG11* de *C. parapsilosis sensu stricto*. No entanto, os dois isolados eram susceptíveis ao

fluconazol e esta espécie raramente desenvolve resistência aos azólicos (Lockhart *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010).

Recentemente, em estudo realizado por Chen e colaboradores em 2010, foi observado que *C. parapsilosis sensu stricto* apresentava valores de MIC significantivamente mais elevados para caspofungina e anidulafungina em relação às espécies *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Porém, quando avaliadas frente ao fluconazol, *C. metapsilosis* foi a espécie menos sensível. Resultados semelhantes também foram encontrados anteriormente por van Asbeck e colaboradores em 2008.

Apesar da observação de que ocorrem diferenças nos padrões de susceptibilidade *in vitro* entre as três espécies do complexo *C. parapsilosis*, na maior parte das vezes os isolados clínicos não apresentam resistência aos medicamentos da classe dos azólicos. Por este motivo, estudos sobre mutações no gene ERG11 destas espécies não foram realizados até o momento.

É importante salientar que não foi possível a análise das sequências obtidas para os três isolados de *C. orthopsilosis* com os *primers* delineados na sequência de *C. parapsilosis sensu stricto* (ATCC 22019). Possivelmente, diferenças na composição nucleotídica do gene ERG11 entre as espécies do complexo *C. parapsilosis*, pode ter acarretado um emparelhamento errôneo dos *primers* com o DNA alvo, levando a ampliações inespecíficas e impossibilitando a análise dos sequenciamentos.

Candida glabrata foi a única espécie em que não foram identificadas mutações de sentido trocado nos isolados avaliados no estudo, entre os

quais dois (174H/06 e 435H/06) que apresentaram susceptibilidade dose dependente (**Tabela 7**). Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (Brun *et al.*, 2004; Sanguinetti *et al.*, 2005; Vandeputte *et al.*, 2009; Berila e Subik, 2010), que somente identificaram mutações silenciosas nas sequências do gene ERG11. Os dados indicam que é provável que alterações na sequência deste gene não estejam envolvidas na aquisição de resistência em *C. glabrata*, e que o mecanismo de resistência mais expressivo na espécie seja a super expressão dos genes CDR1 e CDR2 e/ou mutações no gene *CgPDR1* (regulador transcricional de transportadores ABC).

Além da atuação de outros mecanismos de resistência, o fato de não serem encontradas mutações de sentido trocado no gene ERG11 de *C. glabrata*, sugere que esta espécie sofra menos pressão seletiva na presença de fluconazol devido a sua habilidade em coletar o colesterol do soro humano e inserí-lo em sua membrana plasmática, para substituir o ergosterol, conforme demonstrado em estudos experimentais (Bard *et al.*, 2005; Nakayama *et al.*, 2007).

É provável que um aminoácido importante na interação azol-proteína seja conservado entre as sequências de ERG11p de espécies de *Candida* susceptíveis. Baseando-se nesta premissa, foram alinhadas, através do algoritmo de alinhamento múltiplo *ClustalW2*, nove sequências de ERG11p de sete leveduras (seis espécies de *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae*) e dois fungos filamentosos (*Aspergillus fumigatus* e *Penicillium italicum*)

(Marichal *et al.*, 1999). A **Tabela 8** relaciona os aminoácidos alinhados, obtidos para as 17 mutações identificadas no presente estudo.

Sete aminoácidos (K53, Y132, Y221, L321, R371, S405 e R467) estão conservados em todas as seqüências de ERG11p analisadas. As mutações **Y132F**, **S405F** e **R467I** estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência em *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1998; Favre *et al.*, 1999; Perea *et al.*, 2001; Chau *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2004) e, somadas a estas três, encontram-se as quatro mutações novas identificadas neste estudo (**K53M**, *C. krusei*; **Y221F** e **R371S**, *C. tropicalis*; e **L321F**, *C. albicans*). Tendo em vista esta avaliação, é possível sugerir que as mutações novas estejam relacionadas ao desenvolvimento de resistência ao fluconazol em leveduras do gênero *Candida*.

Tabela 8 – Alinhamento múltiplo (*ClustalW2*) de sequências da enzima 14DM, de nove espécies de fungos, mostrando as mutações de sentido trocado identificadas no estudo. Os aminoácidos idênticos aos de *C. albicans* são representados por um ponto; aminoácidos altamente conservados estão em sombreado; ‘-’ é indicativo de uma lacuna no alinhamento; a posição do aminoácido foi numerada de acordo com a sequência de *Candida* na qual a mutação foi identificada.

Organismo	Acesso GenBank	Mutações (espécie)																
		K53M (Ck)	A61V (Ca)	D116E (Ca)	K128T (Ca)	Y132F (Ca)	Y221F (Ct)	E266D (Ca)	S279F (Ca)	L321F (Ca)	K344T (Ct)	V362M (Ct)	R371S (Ct)	R398I (Cp)	S405F (Ca)	V437I (Ca)	R467I (Ca)	V488I (Ca)
<i>C. albicans</i>	CAA31658	K	A	D	K	Y	Y	E	S	L	K	V	R	K	S	V	R	V
<i>C.dubliniensis</i>	AAK57519	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.
<i>C. glabrata</i>	AAB32679	.	I	A	.	.	.	.	E	.	D	L	.	R	.	A	.	-
<i>C. krusei</i>	AAB32680	.	V	.	.	.	.	A	A	.	N	.	.	.	.	I	.	-
<i>C. parapsilosis</i>	ACT67904	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	A	.	.
<i>C. tropicalis</i>	AAA53284	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I
<i>S. cerevisae</i>	AAA34379	.	V	A	.	.	.	K	.	.	G	L	.	A	.	.	.	I
<i>A. fumigatus</i>	AAK73659	.	I	E	S	.	.	G	N	.	A	H	.	P	.	N	.	.
<i>P. italicum</i>	CAA89824	.	I	E	S	.	F	R	N	.	-	L	.	P	.	S	.	.

Ca = *C. albicans*; Ck = *C. krusei*; Cp = *C. parapsilosis sensu stricto*; Ct = *C. tropicalis*

O papel destas mutações na susceptibilidade aos azólicos não pode ser definido até que dados experimentais sejam obtidos para comprovação. Além disso, outros mecanismos de resistência devem ser identificados nesses isolados, como a superexpressão de MDR1, CDR1 e CDR2, que podem atuar concomitantemente e contribuir para o aumento nos valores de MIC ao fluconazol (White, 2003; Espinel-Ingroff, 2008).

A disposição dos alelos (homozigotia *versus* heterozigose) também deve ser levada em consideração nos fungos diplóides. Uma mutação

ocorrendo em apenas um dos alelos, pode não contribuir significativamente para a sobrevivência da levedura em ambiente contendo fluconazol, a menos que se torne dominante. Assim, a formação de um homozigoto para uma mutação que confira resistência pode ser essencial para a manutenção e expansão desse fenótipo (Asai, 1999; Jones *et al.*, 2004).

Por fim, substituições de aminoácidos que parecem estar restritas a isolados com susceptibilidade reduzida, podem ser úteis como preditores de resistência aos azólicos, bem como para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

7. CONCLUSÕES

As espécies de *Candida* foram facilmente identificadas pela amplificação da região ITS do DNAr por PCR, bem como as espécies do complexo *C. parapsilosis* pelo seqüenciamento.

Os *primers* delineados no estudo revelaram-se adequados, amplificando toda a extensão do exon do gene ERG11 das espécies de *Candida* estudadas.

A técnica de SSCP não foi adequada como método de triagem, pois confrontando os resultados obtidos por esta técnica e pelo seqüenciamento automatizado, não foi observada relação entre os padrões de migração eletroforética e o número e/ou natureza das mutações presentes no gene ERG11 dos isolados do estudo.

Foram identificadas 217 mutações em 53 isolados de *Candida*, incluindo 185 silenciosas e 32 por troca de sentido. Estas últimas foram encontradas em 35,8% dos isolados e identificadas em 17 resíduos diferentes, sendo sete deles ainda não descritos anteriormente: **L321F** em *C. albicans*; **K53M** em *C. krusei*; **Y221F**, **K344T**, **V362M** e **R371S** em *C. tropicalis*; e **R398I** em *C. parapsilosis*. Estas mutações foram identificadas tanto em isolados susceptíveis como em resistentes ao fluconazol. Este fato demonstra que a presença ou ausência de mutações de sentido trocado, não parece ser suficiente para prever a susceptibilidade do microrganismo ao antifúngico, sendo necessária a avaliação concomitante de outros mecanismos de resistência.

8. ANEXOS

Anexo A – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 do isolado 022/05 com a sequência utilizada como referência para *C. orthopisilosis* (*GenBank* - FJ872018).

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 22	280	2 FJ872018	535	99

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

22
FJ872018      GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAAT 60

22
FJ872018      GAAAGTGCTTAACTGCATTTTTTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTTGAAAACCTTGCT 120

22
FJ872018      TTGGTGGGCCCATGGCCTGCCAGAGATTAACTCAACCAAATTTATTTAAGTCAACTGA 180

22
FJ872018      TTAAGTAAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG 23
                TTAAGTAAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG 240
                *****

22
FJ872018      CAGCGAAATGCGATAAGTATATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAA 83
                CAGCGAAATGCGATAAGTA-ATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAA 299
                *****

22
FJ872018      CGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTC 143
                CGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTC 359
                *****

22
FJ872018      AAACCTTCGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTAT 203
                AAACCTTCGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTAT 419
                *****

22
FJ872018      AAATAATGGATAGGTTTTTTTCCACTCATTTGGTACAAACTCCAAAATTCTTCCAAATTC 263
                AAATAATGGATAGGTTTTTTTCCACTCATTTGGTACAAACTCCAAAATTCTTCCAAATTC 479
                *****

22
FJ872018      GACCTCAAATCAGGTAG----- 280
                GACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 535
                *****

```

Anexo B – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 do isolado 023/05 com a sequência utilizada como referência para *C. orthopisilosis* (*GenBank* - FJ872018).

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 23	308	2 FJ872018	535	99

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

23      -----
FJ872018  GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAAT 60

23      -----
FJ872018  GAAAGTGCTTAACTGCATTTTTTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTTGAAACTTTGCT 120

23      -----
FJ872018  TTGGTGGGCCCATGGCCTGCCAGAGATTAACTCAACCAAATTTTATTTAAGTCAACTGA 180

23      -----CTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACG 43
FJ872018  TTAATAATAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACG 240
          *****

23      CAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC 103
FJ872018  CAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC 300
          *****

23      GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCTCTC 163
FJ872018  GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCC-CTC 359
          *****

23      AAACCTTCGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTAT 223
FJ872018  AAACCTTCGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTAT 419
          *****

23      AACTAATGGATAGGTTTTTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAATTCTTCCAAATTC 283
FJ872018  AACTAATGGATAGGTTTTTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAATTCTTCCAAATTC 479
          *****

23      GACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC----- 308
FJ872018  GACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 535
          *****

```


Anexo D – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 do isolado 51 com a sequência utilizada como referência para *C. parapsilosis sensu stricto* (*GenBank* - AY939798).

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 51	291	2 AY939798	520	100

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

51
AY939798      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTT 60

51
AY939798      CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 120

51
AY939798      CTGCCAGAGATTAACTCAACCAAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 180

51
AY939798      -----GGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 47
                    AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 240
                    *****

51
AY939798      AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 107
                    AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 300
                    *****

51
AY939798      TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCTCGGGTTTGG 167
                    TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCTCGGGTTTGG 360
                    *****

51
AY939798      TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 227
                    TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 420
                    *****

51
AY939798      TTTTCCACTCATTGGTACAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 287
                    TTTTCCACTCATTGGTACAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 480
                    *****

51
AY939798      GGAC----- 291
                    GGA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 520
                    ****

```

Anexo E – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 do isolado 57 com a sequência utilizada como referência para *C. orthopsilosis* (*GenBank* - FJ872018).

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 57	325	2 FJ872018	535	99

=====
=====

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

57          -----CAGAAT 6
FJ872018    GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAAT 60
                                     *****

57          GAAAGTGCTTAACTGCATTTTTTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTTGGAAAACTTTGC 66
FJ872018    GAAAGTGCTTAACTGCATTTTTTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTTGG-AAAACTTTGC 119
*****

57          TTTGGTGGGCCCATGGCCTGCCAGAGATTAACTCAACCAAATTTTATTTAAGTCAACTG 126
FJ872018    TTTGGTGGGCCCATGGCCTGCCAGAGATTAACTCAACCAAATTTTATTTAAGTCAACTG 179
*****

57          ATTAATAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAAC 186
FJ872018    ATTAATAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAAC 239
*****

57          GCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAA 246
FJ872018    GCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAA 299
*****

57          CGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTC 306
FJ872018    CGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTC 359
*****

57          AAACCTTCGGGTTTGGTGT----- 325
FJ872018    AAACCTTCGGGTTTGGTGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTAT 419
*****

57          -----
FJ872018    AAATAATGGATAGGTTTTTTTCCACTCATTTGGTACAAACTCCAAAATTCTTCCAAATTC 479

57          -----
FJ872018    GACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 535

```

Anexo F – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 do isolado 59 com a sequência utilizada como referência para *C. parapsilosis sensu stricto* (*GenBank* - AY939798).

SeqA	Name	Len (nt)	SeqB	Name	Len (nt)	Score
1	59	295	2	AY939798	520	100

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

59          -----
AY939798    TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTT 60

59          -----
AY939798    CTTACACATGTGTTTTTCTTTTTTTGAAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 120

59          -----
AY939798    CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 180

59          -----GATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 46
AY939798    AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 240
              *****

59          AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 106
AY939798    AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 300
              *****

59          TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 166
AY939798    TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 360
              *****

59          TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 226
AY939798    TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 420
              *****

59          TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 286
AY939798    TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 480
              *****

59          GGACTACCC----- 295
AY939798    GGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 520
              *****

```


Anexo G – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 do isolado 68 com a sequência utilizada como referência para *C. parapsilosis sensu stricto* (GenBank - AY939798).

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 68	427	2 AY939798	520	100

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

68      -----
AY939798 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAAGTGCATTTTTT 60

68      --TACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACCTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 58
AY939798 CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACCTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 120
          *****

68      CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 118
AY939798 CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 180
          *****

68      AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 178
AY939798 AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 240
          *****

68      AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 238
AY939798 AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 300
          *****

68      TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 298
AY939798 TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 360
          *****

68      TGTTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 358
AY939798 TGTTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 420
          *****

68      TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 418
AY939798 TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 480
          *****

68      GGACTACCC----- 427
AY939798 GGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 520
          *****

```

Anexo H – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 do isolado 100 com a sequência utilizada como referência para *C. parapsilosis sensu stricto* (GenBank - AY939798).

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 100R	460	2 AY939798	520	100

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

100R      -----ACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTT 31
AY939798  TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTT 60
          *****

100R      CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 91
AY939798  CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 120
          *****

100R      CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 151
AY939798  CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 180
          *****

100R      AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 211
AY939798  AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 240
          *****

100R      AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 271
AY939798  AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 300
          *****

100R      TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 331
AY939798  TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 360
          *****

100R      TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 391
AY939798  TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 420
          *****

100R      TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 451
AY939798  TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 480
          *****

100R      GGA TACCC----- 460
AY939798  GGA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 520
          *****

```

Anexo I – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 do isolado 366 com a sequência utilizada como referência para *C. parapsilosis sensu stricto* (GenBank - AY939798).

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 366	478	2 AY939798	520	100

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

366      -----AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTT 55
AY939798 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTT 60
          *****

366      CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 115
AY939798 CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 120
          *****

366      CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 175
AY939798 CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 180
          *****

366      AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 235
AY939798 AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 240
          *****

366      AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 295
AY939798 AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 300
          *****

366      TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 355
AY939798 TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 360
          *****

366      TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 415
AY939798 TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 420
          *****

366      TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 475
AY939798 TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 480
          *****

366      GGA----- 478
AY939798 GGA----- 478
          ***

```

Anexo J – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 do isolado 400 com a sequência utilizada como referência para *C. parapsilosis sensu stricto* (GenBank - AY939798).

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 400	418	2 AY939798	520	100

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

400      -----
AY939798  TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTT 60

400      ---ACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 57
AY939798  CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 120
          *****

400      CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 117
AY939798  CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 180
          *****

400      AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 177
AY939798  AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 240
          *****

400      AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 237
AY939798  AGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 300
          *****

400      TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 297
AY939798  TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGG 360
          *****

400      TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 357
AY939798  TGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 420
          *****

400      TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 417
AY939798  TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 480
          *****

400      G----- 418
AY939798  GGA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 520
          *
```

Anexo L – Alinhamento, através do *software* ClustalW2, entre a sequência nucleotídica da região ITS1/ITS4 da cepa ATCC 22019 com a sequência utilizada como referência para *C. parapsilosis sensu stricto* (GenBank - AY939798).

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 ATCC_22019	452	2 AY939798	520	100

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

ATCC_22019      -----AAAAGTGCTTAAGTGCATTTTTT 23
AY939798      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAAGTGCATTTTTT 60
                *****

ATCC_22019      CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACCTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 83
AY939798      CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAAACCTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC 120
                *****

ATCC_22019      CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 143
AY939798      CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA 180
                *****

ATCC_22019      AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 203
AY939798      AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 240
                *****

ATCC_22019      AGTAATATGAATTGCAGATATTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 263
AY939798      AGTAATATGAATTGCAGATATTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT 300
                *****

ATCC_22019      TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCTCGGGTTTGG 323
AY939798      TGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCTCGGGTTTGG 360
                *****

ATCC_22019      TGTTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 383
AY939798      TGTTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGT 420
                *****

ATCC_22019      TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 443
AY939798      TTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACCTTCTTCCAAATTCGACCTCAAATCAGGTA 480
                *****

ATCC_22019      GGACTACCC----- 452
AY939798      GGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 520
                *****

```

Anexo M **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/12/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1022/08**, intitulado: **"ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE ERG11 EM ISOLADOS DE CANDIDA SPP. SUSCEPTÍVEIS OU RESISTENTES AO FLUCONAZOL."** apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Thelma Suely Okay**

Pesquisador (a) Executante: **Vagner Oliveira Carvalho**

CAPPesq, 04 de Dezembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal D, Patterson TF, Rinaldi MG, Revankar SG. Trailing end-point phenotype of *Candida* spp. in antifungal susceptibility testing to fluconazole is eliminated by altering incubation temperature. *J Med Microbiol.* 2007; 56:1003-4.

Akins R. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 2005; 43: 285-318.

Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2835-41.

Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, Reller LB. Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):698-706.

Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, d'Azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(5):239-41.

Aoyama Y, Yoshida Y, Sonoda Y, Sato Y. Deformylation of 32-oxo-24,25-dihydrolanosterol by the purified cytochrome P-450_{14DM} (lanosterol 14 α -demethylase) from yeast: evidence confirming the intermediate step of lanosterol 14 α -demethylation. *J Biol Chem*. 1989;264:18502-5.

Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, Harrison LH, Sofair AN, Warnock DW. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2477-81.

Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan ZU. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol*. 2009; 58: 745-52.

Asai K, Tsuchimori N, Okonogi K, Perfect JR, Gotoh O, Yoshida Y. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1163-9.

Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíases. *J Bras Doenças Sex Transm*. 2010; 22: 22-38.

Bard M, Sturm A, Pierson C, Brown S, Rogers K, Nabinger S, Eckstein J, Barbuch R, Lees N, Howell S, Hazen K. Sterol uptake in *Candida glabrata*: rescue of sterol auxotrophic strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 52: 285-93.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anat Biochem*. 1991;196: 80-3

Bates PA, Kelley LA, MacCallum RM, Sternberg MJ. Enhancement of protein modelling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins*. 2001;5:39-46.

Bates PA, Sternberg MJ. Model building by comparison at CASP3: using expert knowledge and computer automation. *Proteins*. 1999;3:47-54.

Bauer BE, Wolfger H, Kuchler K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1461: 217-36.

Beckerman JL, Magee PT. Genomics in fungal pathogenesis. In : Calderone RA, Cihlar RL, editores. *Fungal pathogenesis - principles and clinical applications*. New York : Marcel Dekker, 2002. p.261-78.

Bellamine A, Lepesheva G, Waterman MR. Fluconazole binding and sterol demethylation in three CYP51 isoforms indicate differences in active site topology. *J Lipid Res.* 2004;45:2000–7.

Beller EM, Gebiski V, Keech AC. Randomisation in clinical trials. *Med J Aust* 2002; 177 (10):565-7.

Berezovsky IN, Trifonov EN. Protein structure and folding: a new start. *J Biomol Struct Dyn.* 2001;19(3):397-403.

Berila N, Subik J. Molecular analysis of *Candida glabrata* clinical isolates. *Mycopathologia.* 2010;170(2):99-105

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet-Svidzinski TI, Borsato-Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res.* 2008; 8: 442-50.

Bonekamp F, Dalbøge H, Christensen T, Jensen KF. Translation rates of individual codons are not correlated with tRNA abundances or with frequencies of utilization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1989;171:5812-6.

Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Chanoine M. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 925-30.

Boriollo MF, Rosa EA, Gonçalves RB, Höfling JF. Parity among interpretation methods of MLEE patterns and disparity among clustering methods in epidemiological typing of *Candida albicans*. *J Microbiol Methods.* 2006;64(3):346-65.

Brun S, Bergès T, Poupard P, Vauzelle-Moreau C, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(5):1788-96.

Calabrese D, Bille J, Sanglard D. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology.* 2000; 146: 2743-54.

Chapman RL, Faix RG. Invasive neonatal candidiasis: an overview. *Semin Perinatol.* 2003; 27:352-6.

Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):2124-31.

Chen A, Sobel JD. Emerging azole antifungals. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2005;10(1):21-33.

Chen SC, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol*. 2002;40(4):333-57.

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulion-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 2302-10.

Chen YC, Lin YH, Chen KW, Lii J, Teng HJ, Li SY. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 68: 284-92.

Chothia C, Lesk AM. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*. 1986;5:823-6.

Ciardo DE, Schär G, Böttger EC, Altwegg M, Bosshard PP. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 77-84.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standards — Third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:599-607

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 2816-23.

Contreras-Moreira B, Bates PA. Domain fishing: a first step in protein comparative modelling. *Bioinformatics*. 2002;18:1141-2.

Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, Berman J, Sanglard D. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell*. 2007;6(10):1889-904.

Cowen LE, Sanglard D, Calabrese D, Sirjusingh C, Anderson JB, Kohn LM. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 2000;182: 1515-22.

d'Enfert C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets*. 2006;7: 465-70.

Díaz-López M, Oliveros-Garay O, Orozco-Díaz O. Análisis SSCP (ITS2, ERG11) de aislamientos clínicos de *Candida* spp. de cavidad oral en pacientes oncológicos. *Rev Iberoam Micol*. 2004; 21:182-6.

Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*. 2002; 19 :139-43.

Duret L. Evolution of synonymous codon usage in metazoans. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12:640-9.

Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol*. 2005;43:65-84.

Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol*. 2008; 25: 101-6.

Favre B, Didmon M, Ryder N. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology*. 1999; 145: 2715-25.

Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhauser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42: 3065-72.

Franz R, Ruhnke M, Morschhäuser J. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses.* 1999; 42: 453–8.

Fukuoka T, Johnston DA, Winslow CA. Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 1213-19.

Goldman G, Ferreira M, Marquesa E, Savoldia M, Perlin D, Park S, Martinez P, Goldman M, Colombo A. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 50: 25–32.

Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 1506-9.

Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan AC, Briones MR, Melo AS, Colombo AL. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:885-7.

Gouy M, Gautier C. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res*. 1982;10:7055-74.

Guinea J, Sánchez-Somolinos M, Cuevas O, Peláez T, Bouza E. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of efflux-pumps. *Med Mycol*. 2006;44:575-8.

Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol*. 2002;40(1):87-109.

Ji H, Zhang W, Zhou Y, Zhang M, Zhu J, Song Y, Lü J. A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J Med Chem*. 2000; 43: 2493-505.

Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:7329-34.

Kelly SL. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta 5,6$ -desaturation. *FEBS*. 1997; 80-2.

Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC Kelly DE. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3,6diol. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 207: 910-5.

Kelly SL, Lamb DC, Loeffler J, Einsele H, Kelly DE. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;19;262:174-9.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. 9a. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Lai MH, Kirsch DR. Nucleotide sequence of cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14 α -demethylase) from *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res*. 1989; 25;17: 804.

Lamb DC, Kelly DE, Kelly S. Molecular aspects of azole antifungal action and resistance. *Drug Resist Updat*. 1999; 2:390-402.

Lamb DC, Kelly DE, Schunck WH, Shyadehi AZ, Akhtar M, Lowe DJ, Baldwin BC, Kelly SL. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 5682-88.

Lamb DC, Kelly DE, White TC, Kelly SL. The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 63-7.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2. *Bioinformatics.* 2007; 23: 2947-8.

Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:217-24.

Levy I, Rubin LG, Vasishtha S, Tucci V, Sood SK. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis.* 1998;26(5):1086-8.

Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:1815-21.

Liu XP, Fan SR, Bai FY, Li J, Liao QP. Antifungal susceptibility and genotypes of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses.* 2008;52(1):24-8

Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2659-64.

Loeffler J, Hagmeyer L, Hebart H, Henke N, Schumacher U, Einsele H. Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. *Clin Chem.* 2000;46:631-5.

Lunn G, Sansone EB. Ethidium bromide destruction and descontamination of solutions. *Anal Biochem,* 1987;162: 453-8.

Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2860-5.

Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FC, Odds FC, Bossche HV. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology*. 1999;145(10):2701-13.

Miyazaki T, Miyazaki Y, Kakeya H, Miyazaki H, Nakamura K, Kohno S. in: Abstracts in 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2001; Chicago. Abstract J-1840.

Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;66:373-84.

Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1587: 240-8.

Moura GR, Paredes JA, Santos MAS. Development of the genetic code: insights from a fungal codon reassignment. *FEBS Letters*. 2010; 584:334-41

Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat*. 2004; 7:301-9.

Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS, Maixner W, Diatchenko L. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*. 2006;314:1930-3.

Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami NS, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene CgAUS1 protects cells against azoles in the presence of serum. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60:1264-72.

Nirenberg M, Leder P, Bernfield M, Brimacombe R, Trupin J, Rottman F, O'Neal C. RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. *Proc Natl Acad Sci*. 1965; 53: 1161-8.

Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58:77-82.

Odds FC, Brown AJ, Gow NA. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biol*. 2004;5: 230.

Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martinez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 2676-84.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007;45(4):321-46.

Pfaller MA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. Validation of 24-hour fluconazole MIC readings versus the CLSI 48-hour broth microdilution reference method: results from a global *Candida* antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2008;46(11):3585-90

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 133-63.

Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretative breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 435-47.

Rodríguez-Tudela J, Cuesta I, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M. Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26: 47-53.

Roy B, Meyer SA. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 216-18.

Sandven P. Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micol*. 2000;17:73-81.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977; 74: 5463-7.

Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 2300-5.

Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology*. 1997; 143: 405-16.

Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 241-53.

Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 3: 2378-86.

Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 668-79.

Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1987;25(4):675-9.

Sugita T, Nishikawa A. Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2004; 45: 55-8.

Tavanti A, Davison AD, Grow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 284-92.

Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27:359-66.

van Asbeck E, Clemons KV, Martinez M, Tong AJ, Stevens DA. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62:106-9

van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol*. 2009; 35: 283-309

van Burik JA, Schreckhise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol*. 1998;36: 299-303.

Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4608-15.

Vandeputte P, Tronchin G, Rocher F, Renier G, Bergès T, Chabasse D, Bouchara JP. Hypersusceptibility to azole antifungals in a clinical isolate of *Candida glabrata* with reduced aerobic growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 3034-41.

Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, Chaanock SJ. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J. Clin Microbiol*. 1995; 33: 3216-20.

Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet.* 2007; 8:749–61.

Wang QM, Li J, Wang SA, Bai FY. Rapid differentiation of phenotypically similar yeast species by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74: 2604-11.

Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2007;48(1):1-12.

White TC. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 α demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:1488-94.

White TC, Holleman S, Dy F, Mirels L, Stevens D. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1704–13.

White TC , Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11: 382-402.

Wirsching S, Michel S, Morschhäuser J. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol.* 2000;36:856-65.

Xiao L, Madison V, Chau AS. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 568-74.

Xu Y, Chen L, Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 798–804.

Yamamura ML, Abramczyk ML, Carvalho ES. Fungemias em pediatria. Parte I. *Pediatr Moderna.* 2001; 7: 286-304.

Zhang Y, Skolnick J. The protein structure prediction problem could be solved using the current PDB library. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:1029-34.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Susceptibilidade dos isolados de *C. tropicalis* (Ct), *C. albicans* (Ca), *C. parapsilosis* (Cp), *C. glabrata* (Cg) e *C. krusei* (Ck) ao fluconazol, de acordo com os valores de MIC encontrados no teste de microdiluição M27-A3 (CLSI, 2008).

Apêndice 2– *Primers* utilizados no estudo para a identificação molecular das espécies de *Candida*

<i>Primers</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Hibridização</i>	<i>Amplificado</i>	<i>Referência</i>
CALB1/2 <i>C. albicans</i>	F: 5'-TTTATCAACTTGTCACACCAGA-3' R: 5'-ATCCCGCCTTACCACTACCG-3'	55°C	272bp	Luo <i>et al.</i> , 2002
CGL1/2 <i>C. glabrata</i>	F: 5'-TTATCACACGACTCGACACT-3' R: 5'-CCCACATACTGATATGGCCTACAA-3'	52°C	423bp	Luo <i>et al.</i> , 2002
CPAR3/2 <i>C. parapsilosis</i>	F: 5'-GCCAGAGATTAAACTCAACCAA-3' R: 5'-CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC-3'	52°C	297bp	Luo <i>et al.</i> , 2002
CTR1/2 <i>C. tropicalis</i>	F: 5'-CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT-3' R: 5'-TGGCCCTAGCAAAATAAGCGT-3'	52°C	357bp	Luo <i>et al.</i> , 2002
CKR2/3 <i>C. krusei</i>	F: 5'-ACTACACTGCGTGAGCGGAA-3' R: 5'-AAAAAGTCTAGTTCGCTCGG-3'	52°C	362bp	Bougnoux <i>et al.</i> , 1999

Apêndice 3 – Revisão de todas as substituições de aminoácidos em ERG11p, Descritas por Morio *et al.* (2010) em isolados de *C. albicans*.

Amino acid substitutions in Erg11	Hot spot	References	Notes
Y33C		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
F14L		Sanglard and Bille, 2002	
V19A		Sanglard and Bille, 2002	
L35S		Sanglard and Bille, 2002	
Y39C		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
R44G		Sanglard and Bille, 2002	
P49R/T		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
W54Stop		Cernicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
W57K		Sanglard and Bille, 2002	
A61V ^{a,b}		Chau et al., 2004	Associated with resistance. Responsible for a 4-fold increase in FLZ MIC. Residue suspected to interact with POS and ITZ binding
F72L		Favre et al., 1999; Marichal et al., 1999	Described in azole-susceptible isolates
Y79C		Goldman et al., 2004	Described in combination with T199I in an FLZ-resistant isolate
D81G		Long et al., 2002	
F83Y		Jiang et al., 2006	
K90E		Sanglard and Bille, 2002	
K99T		Goldman et al., 2004	Described in combination with amino acid changes involved in azole resistance in an isolate with a moderately high FLZ MIC (8 µg/mL)
G100E		Sanglard and Bille, 2002	
F105L	I	Löffler et al., 1997	Described in azole-resistant strains as a single mutation or in combination with amino acid changes involved in azole resistance
A107T	I	Chau et al., 2004	Described as a single mutation in sequential isolates displaying a reduced susceptibility to FLZ
K108E	I	Wang et al., 2009	Described in combination with Y132H and S405F in an FLZ- and VOR-resistant isolate
S110P	I	Sanglard and Bille, 2002	
A114S	I	Jiang et al., 2006; Xu et al., 2008	Described as a single mutation in FLZ resistant isolates
A114V	I	Sanglard and Bille, 2002	
D116E ^b	I	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Marichal et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998; White et al., 2002; Xu et al., 2008	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
K119L	I	Cernicka and Subik, 2006	Described in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
K119N	I	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
F126L ^b	I	Favre et al., 1999; Perea et al., 2001	Described in azole-resistant isolates. Responsible for an increase in FLZ MIC when combined with K143R, E266D, S405F, or V437I
K128T ^b	I	Chau et al., 2004; Löffler et al., 1997; Marichal et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998; White et al., 2002; Xu et al., 2008	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates

Amino acid substitutions in Erg11	Hot spot	References	Notes
G129A ^{a,b}	I	Sanglard et al., 1998	Described in an FLZ- and ITZ-resistant isolate. G129A alone is not sufficient to increase FLZ MIC. Cumulative effect with G464S
V130I	I	Goldman et al., 2004	Described in an FLZ-resistant isolate
Y132F ^b	I	Chau et al., 2004; Goldman et al., 2004; Perea et al., 2001	Associated with resistance. Significantly increase FLZ MIC
Y132H ^{a,b,c}	I	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Kakeya et al., 2000; Marichal et al., 1999; Sanglard et al., 1998; Xu et al., 2008	Associated with resistance. Responsible for a 4-fold increase in FLZ MIC. Cumulative effect with S405F and R467K
N136Y	I	This article	Described in combination with Y132H in a single isolate with reduced azole susceptibility
R138K	I	Sanglard and Bille, 2002	
M140T	I	Sanglard and Bille, 2002	
M140R	I	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
K143E ^b	I	Favre et al., 1999; Goldman et al., 2004	Described in combination T229 and P503L in isolates with reduced azole susceptibility. K143E significantly increase FLZ MIC when combined with T229A
K143R ^b	I	Chau et al., 2004; Goldman et al., 2004; Lee et al., 2004; Manavathu et al., 1999; Perea et al., 2001; White et al., 2002	Associated with resistance. Responsible for a 64-fold increase in FLZ MIC
F145L	I	Chau et al., 2004; Goldman et al., 2004	Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
K147R	I	Löffler et al., 1997	Described in an azole-susceptible isolate
A149V	I	Marichal et al., 1999	Described in FLZ- and ITZ-resistant isolates
D153E	I	Marichal et al., 1999	Described in an azole-susceptible isolate
R157K	I	Sanglard and Bille, 2002	
V159I	I	This article; Sanglard and Bille, 2002	Described in combination with D116E and K128T in azole-susceptible isolates
K161N	I	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
R163T	I	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
E165Y	I	Marichal et al., 1999	Described in an azole-susceptible isolate
E165K	I	Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
S175G		Sanglard and Bille, 2002	
T199I		Goldman et al., 2004	Described in combination with Y79C in an azole-resistant isolate
S203F		Sanglard and Bille, 2002	
F205L		Sanglard and Bille, 2002	
Y221H		This article	Described in an single-azole susceptible isolate
D225Y		Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
D225H		Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
T229A ^b		Favre et al., 1999; Perea et al., 2001	Described in azole-resistant isolates. Responsible for a significant increase in FLZ MIC when combined with F449S or K143E
P230L		Li et al., 2004; Xiao et al., 2004	In combination with other amino acid changes, P230L confers increase resistance to POS and ITZ. P230 is predicted to be in close contact with POS side chain
N237Y		Sanglard and Bille, 2002	
I253V		Goldman et al., 2004	Described as a single mutation in an azole-resistant isolate
Y257H ^b		Chau et al., 2004; Xiao et al., 2004; Xu et al., 2008	Only described in azole-resistant isolates. Combination with G464S significantly increases FLZ MIC
R265G		Goldman et al., 2004	Described in an azole-susceptible isolate
E266D	II	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Goldman et al., 2004; Löffler et al., 1997; Marichal et al., 1999; White et al., 2002; Xu et al., 2008	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
E266Q ^b	II	Sanglard et al., 1998	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible isolates
R267H	II	Manavathu et al., 1999	Described in combination with K128T, K143R, E266D, and D278E in 2 FLZ resistant isolates
K274H	II	Sanglard and Bille, 2002	
L276S	II	This article	Described in a single azole-susceptible isolate
D278N ^b	II	Li et al., 2004	Described in combination with D116E, K128T, Y132H, and G464S in sequential azole-resistant isolates

Amino acid substitutions in Erg11	Hot spot	References	Notes
D278E	II	Manavathu et al., 1999	Described in combination with D116E, K128T, K143R, E266D, and R267H in 2 FLZ-resistant isolates
S279F	II	Marichal et al., 1999	Described in combination with Y132H and G465S in an FLZ- and ITZ-resistant isolate
H283D	II	Goldman et al., 2004	Described as a single mutation in an isolate with reduced azole susceptibility to FLZ
H283R	II	Chau et al., 2004	Described in combination with Y132H and G464S in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
K287R	II	Löffler et al., 1997; Manavathu et al., 1999	Described only in azole-resistant isolates
D294G		Long et al., 2002	
A298T		Sanglard and Bille, 2002	
A298V		Sanglard and Bille, 2002	
G303D		Goldman et al., 2004	Described in an azole-susceptible isolate
I304N		Sanglard and Bille, 2002	
I304T		Sanglard and Bille, 2002	
L305P		Goldman et al., 2004	Described in an azole-susceptible isolate
G307S ^b		Chau et al., 2004; Goldman et al., 2004; Perea et al., 2001	Probably involved in azole resistance. Mutation only described in azole-resistant isolates. Combination with D116E and G450E or Y257H and G464S confers azole resistance
H310R		Sanglard and Bille, 2002	
H334C		Sanglard and Bille, 2002	
K342R		Goldman et al., 2004	Described in an azole-susceptible isolate
K344R		Sanglard and Bille, 2002	
P360S		Sanglard and Bille, 2002	
I366T		Sanglard and Bille, 2002	
H373L		Sanglard and Bille, 2002	
M374V		Long et al., 2002	
P375Q		Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
L376V		Sanglard and Bille, 2002	
F380L		Sanglard and Bille, 2002	
F380S		Goldman et al., 2004	Described as a single mutation in an FLZ-resistant isolate
R381I		Xu et al., 2008	Described in an azole-susceptible isolate
P386L		Long et al., 2002	
E391G		Wang et al., 1999	
K398N		Sanglard and Bille, 2002	
H400R		Long et al., 2002	
V404L		Maebashi et al., 2003	Described in an FLZ-resistant isolate
V404I		Lee et al., 2004	Described in an isolate with reduced azole susceptibility to FLZ
S405I^{a,b,c}	III	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998	Associated with resistance. Responsible for a 4-fold increase in FLZ MIC. Cumulative effect with Y132H
S405P	III	Sanglard and Bille, 2002	
G421D	III	Sanglard and Bille, 2002	
R426K	III	Sanglard and Bille, 2002	
A432C	III	Sanglard and Bille, 2002	
V437I ^b	III	Favre et al., 1999; Goldman et al., 2004; Lee et al., 2004; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998; White et al., 2002	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
V439L	III	Sanglard and Bille, 2002	
N440K	III	Wang et al., 2005	
S442F	III	Sanglard and Bille, 2002	
G443E	III	Sanglard and Bille, 2002	
D446G	III	Sanglard and Bille, 2002	
D446N ^b	III	Perea et al., 2001	Described in an FLZ-resistant isolate. Combination with V437I has been associated with a significant increase in FLZ MIC
Y447G	III	Sanglard and Bille, 2002	
<u>Y447H</u>	III	This article	Described in combination with G307S in a single isolate with a reduced azole susceptibility to FLZ and ITZ
G448E	III	Löffler et al., 1997	Described in an FLZ- and ITZ-resistant isolate
G448R	III	White et al., 2002	Described in an FLZ- and ITZ-resistant isolate

Amino acid substitutions in Erg11	Hot spot	References	Notes
G448V ^b	III	Chau et al., 2004	Described in combination with Y132H in 2 FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolates. Responsible for a 64-fold increase in FLZ MIC when combined with Y132H
F449L	III	Favre et al., 1999	Described in combination with D116E and Y132H in an FLZ- and ITZ-resistant isolate
F449S^b	III	Chau et al., 2004; Perea et al., 2001	Associated with resistance. Responsible for a significant increase in FLZ MIC
F449V	III	Lee et al., 2004	Described as a single mutation in an isolate with reduced azole susceptibility to FLZ
F449Y	III	Xu et al., 2008	Described as a single mutation in an FLZ-resistant isolate
G450E ^b	III	Chau et al., 2004; Favre et al., 1999; Goldman et al., 2004; Löffler et al., 1997; Perea et al., 2001	Described only in azole-resistant isolates. Combination with D116E or Y132H increase FLZ MIC
G450R	III	Sanglard and Bille, 2002	
G450V	III	Wang et al., 2009	Described in combination with G307S in an FLZ-resistant isolate
V452A	III	Chau et al., 2004; Marichal et al., 1999	Described only in azole-resistant isolates
V456I	III	This article; Sanglard and Bille, 2002	Described in combination with E266D, G464S, and V488I in a single FLZ-resistant isolate
Y460H	III	Sanglard and Bille, 2002	
G464S^{a,b,c}	III	Chau et al., 2004; Franz et al., 1998; Li et al., 2004; Löffler et al., 1997; Marichal et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998	Associated with resistance. Responsible for a 64-fold increase in FLZ MIC. Cumulative effect with G129A and R467K
G465S	III	Marichal et al., 1999	Described in combination with Y132H and S279F in an isolate with reduced azole susceptibility to FLZ and ITZ
R467I ^b	III	Chau et al., 2004	Described in combination with G464S in an FLZ- and VOR-resistant isolate. Responsible for an 8-fold increase in FLZ MIC when combined with K128T and G464S
R467K^{a,b,c}	III	Lamb et al., 2000; Lee et al., 2004; Sanglard et al., 1998; White, 1997	Associated with resistance. Responsible for a 4-fold increase in FLZ MIC. Cumulative effect with G464S. Reduce CYP51 affinity for FLZ
H468Y	III	Sanglard and Bille, 2002	
I471T^a	III	Kakeya et al., 2000; Xu et al., 2008	Associated with resistance. Cumulative effect with Y132H
I471V	III	Sanglard and Bille, 2002	Mutation only described in azole-resistant isolates
Q474K	III	Long et al., 2002; Xu et al., 2008	Described as a single mutation in an FLZ-resistant isolate
L480S	III	Sanglard and Bille, 2002	
T486P	III	Cemicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
F487L	III	Wang et al., 1999	
V488I	III	Chau et al., 2004; Franz et al., 1998; Goldman et al., 2004; Löffler et al., 1997; Xu et al., 2008	Not associated with resistance. Described in azole-susceptible and azole-resistant isolates
V488G	III	Wang et al., 1999	
L491V		Cemicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
R492G		Sanglard and Bille, 2002	
T494A		Cemicka and Subik, 2006	Described in combination with other amino acid changes in an FLZ-, ITZ-, and VOR-resistant isolate
T494I		Sanglard and Bille, 2002	
T494P		Wang et al., 1999	
P503L		Goldman et al., 2004	Described in combination with K143E in an FLZ-resistant isolate
D504G		Wang et al., 1999	
V509M		Chau et al., 2004; Lee et al., 2004	Described only in azole-resistant isolates
T513P		Sanglard and Bille, 2002	
W520G		Sanglard and Bille, 2002	
W520R		Sanglard and Bille, 2002	
E521D		Sanglard and Bille, 2002	

For each amino acid change, notes regarding the putative involvement in azole resistance and references are given. The new mutations identified in this study are underlined. Amino acid changes depicted in boldface have been clearly associated with azole resistance using the following in vitro experiments: a) increased MIC after heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* by site-directed mutagenesis, b) or functional expression of *C. albicans* PCR-amplified *ERG11*, c) or decreased affinity of lanosterol 14 α -demethylase for azole. The location of the 3 hot spot regions (I, II, and III) is indicated. FLZ = fluconazole; ITZ = itraconazole; VOR = voriconazole; POS = posaconazole.