



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL  
/BIOPROSPECÇÃO**

**DANIELLY BERHALDO DOS SANTOS SILVA**

**FILOGENIA E BIOPROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE  
ERG11 DE ISOLADOS CLÍNICOS DO GÊNERO *Candida***

**DOURADOS – MS  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais**

**FILOGENIA E BIOPROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE  
ERG11 DE ISOLADOS CLÍNICOS DO GÊNERO *Candida***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, por Danielly Beraldo dos Santos Silva, para obtenção do título de Mestra em Biologia Geral/Bioprospecção, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alexéia Barufatti Grisolia.

**DOURADOS - MS**  
**2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S586f	<p>Silva, Danielly Beraldo dos Santos. Filogenia e bioprospecção de mutações no gene ERG11 de isolados clínicos do gênero <i>Candida</i>. / Danielly Beraldo dos Santos. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 77f.</p> <p>Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alexéia Barufatti Grisolia. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Levedura. 2. Relação evolutiva. 3. Lanosterol 14<math>\alpha</math>-demetilase. 4. Voriconazol. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD – 575.9</p>
-------	--

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

“FILOGENIA E BIOPROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE ERG11 DE ISOLADOS CLÍNICOS DO GÊNERO *Candida*”.

POR

**DANIELLY BERALDO DOS SANTOS SILVA**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: “BIOPROSPECÇÃO”.



PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ALEXEIA BARUFATTI GRISOLIA  
ORIENTADORA – UFGD



PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. KELLY MARI PIRES DE OLIVEIRA  
MEMBRO TITULAR – UFGD



PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARILENE RODRIGUES CHANG  
MEMBRO TITULAR – UFMS / CÂMPUS CAMPO GRANDE

Aprovada em 19 de fevereiro de 2015.

*"O Senhor não olha tanto a grandeza das nossas obras. Olha mais o amor  
com que são feitas"*

*(Santa Teresa de Ávila)*

*Dedico este trabalho a toda  
minha família e amigos que  
lutam diariamente ao meu lado,  
com alegria e amor.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas graças concebidas, por todos os dias de alegria e paz, por iluminar meu caminho para que eu o trilhasse sem medo e cheio de esperanças. “Porque aos teus anjos ele mandou para que te guarde pelos teus caminhos” (Salmos 90, 11).

À minha família (Avós, Tios, Tias, Primos e Agregados), que me entenderam, amaram e apoiaram durante minha formação. Em especial, à minha irmã Nadielly e aos meus pais (Edson e Iraci), por me ensinar a conduzir a vida com dignidade, sabedoria e humildade, por todo amor e carinho. “Percebe e entende que os melhores amigos são aqueles que estão em casa, esperando por ti. Acredita, nos momentos mais difíceis da vida, eles sempre estarão por perto, pois só sabem te amar” (Anjos de Resgate).

A todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal da FCA, especialmente ao André, Alexandre, Bruno, Jéssica, Joyce e a Jussara. Obrigada não só pelo auxílio nas pesquisas, como também pela amizade, pelos momentos de descontração, compreensão e fidelidade. “A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade” (Clarice Lispector).

Às minhas queridas amigas Ana Rafaely, Lara, Patrícia e Valeska, em vocês sempre encontro o apoio para todas as ocasiões. Vocês acrescentam a felicidade em meus dias. Obrigada pela amizade, pela confiança e cumplicidade. “Por toda minha Vida”, “E se na distância tu te ausentas pelo poder que há na saudade voltarás” (Pe Fábio de Melo).

A todos os amigos do grupo de Jovens Emaús, mesmo que indiretamente me ajudaram em todos esses anos, incentivando, apoiando, confiando e principalmente intercedendo junto a Deus pelos meus sonhos e pela minha vida. Muito obrigada por tornar os meus dias mais alegres, pela paciência, por estarem ao meu lado e por me acolherem como amiga. “Fica conosco, pois já é tarde e o dia declina” (Lucas 24,29).

Agradeço a Dr<sup>a</sup> Alexéia Barufatti Grisolia que desde a graduação tive o privilégio de tê-la como minha professora e orientadora. Muito obrigada pelas oportunidades, amizade e também pela confiança. Obrigada pelos momentos de descontração, pelos risos, pelas discussões científicas, pela sua paciência em me ajudar e ensinar, além dos conselhos profissionais e pessoais. “Era uma raposa igual a cem mil outras, mas fiz dela um amigo. Ela é agora única no mundo” (O pequeno príncipe).

Agradeço imensamente a Dr.<sup>a</sup> Kelly Mari Pires de Oliveira pela gentileza em colaborar do início ao final do projeto, além dos conselhos profissionais e pessoais. Também agradeço imensamente a Luana M. C. Rodrigues e a Adriana A. Almeida por toda ajuda desde a elaboração do projeto no quesito microbiologia, como também na execução do mesmo.

Agradeço imensamente o Dr. Rodrigo Matheus Pereira pelas contribuições e apontamentos relacionados às análises de bioinformática que foram de fundamental importância para a obtenção dos resultados e desenvolvimento do artigo a ser apresentados na minha dissertação. Agradeço também a Professora Dr.<sup>a</sup> Marilene Rodrigues Chang pelas contribuições relacionadas à biologia molecular de microrganismos.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da UFGD. Também aos técnicos administrativos da FCBA/UFGD, especialmente ao Paulo Henrique por toda ajuda nas questões administrativas relacionadas ao Programa de Pós-Graduação.

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio logístico, à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.



## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	9
ABSTRACT.....	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-Fatores genéticos da resistência em espécies de <i>Candida</i> .....	12
Resumo.....	12
Introdução.....	13
Características Gerais.....	13
Identificação e caracterização molecular .....	15
Antifúngicos e mecanismos de resistência.....	21
Polienos.....	23
Análogos de Pirimidina.....	23
Azóis.....	24
Equinocandinas.....	26
Referências.....	28
HIPÓTESE.....	38
OBJETIVOS	
Gerais.....	38
Específicos.....	38
CAPITULO I- Novas mutações de ponto no gene ERG11 em isolados clínicos do gênero <i>Candida</i> com perfil de resistência aos azóis.....	40
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	47
Discussão.....	52
Conclusão.....	56
Agradecimentos.....	56
Referências.....	56
Arquivo Suplementar.....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
ANEXO I: Submissão dos artigos e normas da revista.....	62
ANEXO II: Currículo Lattes.....	65

## RESUMO GERAL

As espécies de *Candida* apresentam grande relevância clínica devido à incidência de colonização e infecção no organismo humano. Em alguns casos essas tem apresentado resistência aos antifúngicos, principalmente, aos azóis. O principal alvo dos azóis é a enzima-chave (lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase ou Erg11p) na via de biossíntese do ergosterol, codificada pelo gene ERG11. Dessa forma alterações neste gene podem conduzir a diminuição da afinidade dos azóis para o seu alvo e, por conseguinte, provocar a resistência ao medicamento. O objetivo do trabalho foi identificar mutações na região codificadora do gene ERG11 em isolados clínicos do gênero *Candida*, com perfil de resistência aos azóis. Para tanto foram amplificadas as regiões codificadoras do gene ERG11 provenientes de isolados clínicos do gênero *Candida* com perfil de resistência estabelecido para o fluconazol, itraconazol e voriconazol. Além da identificação das mutações também foi estabelecido a relação filogenética e construída rede haplotípica entre as espécies de *Candida*, com isso foi possível verificar divergências entre as sequencias, contribuindo para a compreensão da história evolutiva. Este estudo promoveu a identificação de novas mutações na região codificadora do gene ERG11 em isolados clínicos do gênero *Candida*, com destaque para a mutação de não sinônima, A497C (Y166S), a qual pode ter associação com a resistência ao voriconazol em *C. krusei*. Essa alteração genética, se comprovada sua associação, pode gerar informações para a prospecção de novos alvos terapêuticos, e desenvolvimento de novos fármacos para espécies de *Candida* resistentes aos azóis.

**Palavras-chave:** levedura, relação evolutiva, lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, voriconazol, Y166S

## ABSTRACT

*Candida* species have great clinical relevance because of the incidence of colonization and infection in humans. In some cases these have shown resistance to antifungal agents, mainly to azoles. The main target of azoles is the key enzyme (lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase or Erg11p) in the ergosterol biosynthetic pathway, encoded by ERG11 gene. Thus changes in this gene may lead to decreased affinity of azoles for their target and thus lead to drug resistance. The aim was to identify mutations in the coding region of ERG11 gene in clinical isolates of *Candida*, with the azole resistance profile. Therefore, we amplified the coding regions of ERG11 gene from clinical isolates of *Candida* with resistance profile established for fluconazole, itraconazole and voriconazole. In addition to the identification of mutations was also established the phylogenetic relationship and built haplotype network between *Candida* species, it was possible to see differences between the sequences, contributing to the understanding of evolutionary history. This study promoted the identification of new mutations in the coding region of ERG11 gene in clinical isolates of *Candida*, especially the mutation of meaning changed, A497C (Y166S), which can be associated with resistance to voriconazole in *C. krusei*. This genetic change, if proven its association, can generate information for the exploration of new therapeutic targets and development of new drugs for *Candida* species resistant to azoles.

**Keywords:** yeast, evolutionary relationship, lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase, voriconazole, Y166S

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo de Revisão submetido na revista *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.

Qualis 2015: A2 para Biodiversidade.

Revisão formatada de acordo com as normas da Revista *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (Anexo I).

## FATORES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA EM ESPÉCIES DE *Candida*

Danielly Beraldo dos Santos Silva<sup>a</sup>, Alexéia Barufatti Grisolia<sup>a\*</sup>, Kelly Mari Pires de Oliveira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

\*Autor Correspondente: Alexéia Barufatti Grisolia

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Rodovia Dourados-Itahum KM 12, Caixa postal: 533, CEP: 79804-970, Dourados/ Mato Grosso do Sul/ Brasil

Telefone: +55 (067) 34102223

Email: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br

### Resumo

O sequenciamento dos genomas de algumas espécies de *Candida* possibilitou elucidar alguns dos mecanismos referentes à resistência intrínseca ou adquirida por essas leveduras, entretanto não havia relatos anteriores que de forma detalhada pudesse reunir pesquisas de diversos anos e de diferentes países as quais utilizaram as mais recentes técnicas de biologia molecular, tanto para identificação e caracterização molecular, como também os fatores e mecanismos moleculares envolvidas na resistência aos antifúngicos de espécies de *Candida*. Nesse sentido essa abordagem pode auxiliar na investigação epidemiológica e também na prospecção de novos alvos moleculares para as moléculas bioativas com atividade antifúngica, em especial, para espécies de *Candida* resistentes. Considerando a abrangência multidisciplinar do assunto, esta revisão teve como objetivo abordar os fatores e mecanismos moleculares, envolvidos tanto na identificação como também na elucidação das causas da resistência de *Candida* spp aos antifúngicos.

**Palavras-Chave:** Antifúngicos, Candidiase, Caracterização Molecular, Mutações, Supressão

## 1. Introdução

Leveduras do gênero *Candida* podem causar diversos tipos de infecções com amplo espectro de apresentações clínicas, desde formas cutâneo-mucosas benignas até invasivas, que comprometem diversos órgãos humanos (YANG, 2003). A profilaxia ou o tratamento prolongado com antifúngicos tem aumentado a incidência de isolados clínicos de *Candida* spp. resistentes a esses fármacos (SANGLARD et al., 2003). Nesse sentido, a identificação e caracterização desses isolados em nível molecular são importantes para o entendimento da propagação das espécies de *Candida* e dos mecanismos de resistência aos antifúngicos (BAIXENCH et al., 2007).

A resistência de *Candida* spp. aos antifúngicos pode ser atribuída a mutações e aumento da expressão de genes, ou outras alterações do alvo da droga (BARKER & ROGERS, 2006). Estudos mostraram que mutações ou superexpressão em alguns genes que estão envolvidos na biossíntese de ergosterol, como ERG11, ERG6, ERG3 e ERG2, têm sido associados a diminuição da suscetibilidade aos azóis e polienos em diferentes espécies de *Candida* (SANGLARD et al., 2003; VANDEPUTTE et al., 2005; HULL et al., 2012; CARVALHO et al., 2013). Assim sendo, investigar os fatores genéticos, em especial, os genes associados à resistência aos antifúngicos é de extrema importância, principalmente nas espécies de *Candida*, pelo aumento de infecções graves e também por, em alguns casos, apresentar resistência cruzada aos medicamentos (ZIMBECK et al., 2010; CARVALHO et al., 2013).

Nesse sentido, a identificação molecular das espécies e detecção das alterações ocorridas nas sequências dos genes associados à resistência, podem ser úteis na investigação epidemiológica e também na prospecção de novos alvos moleculares para as moléculas bioativas com atividade antifúngica, em especial, para espécies de *Candida* resistentes. Considerando a abrangência multidisciplinar do assunto, esta revisão teve como objetivo abordar os fatores e mecanismos moleculares, envolvidos tanto na identificação como também na elucidação das causas da resistência de *Candida* spp aos antifúngicos.

## 2. Características Gerais

*Candida* spp. são classificadas taxonomicamente no reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, família Saccharomycetaceae e gênero *Candida*. Essas leveduras são microrganismos unicelulares, pleomórficos de forma ovóide ou

esférica, ciclo sexual incompleto. *Candida* spp habitam comensalmente o organismo do homem, podendo ser encontradas no trato respiratório, gastrointestinal, mucosa vaginal, cavidade oral e pele de indivíduos saudáveis (BARBEDO & SGARBI, 2010), também podem ser isolada em vegetais, água, solo, entre outros. Além disso, são capazes de degradar proteínas e carboidratos como fonte de carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

A relação entre a microbiota autóctone de *Candida* spp. e o hospedeiro homem pode ser alterada devido a fatores patológicos, fisiológicos, mecânicos e iatrogênicos. Nesse sentido, espécies do gênero *Candida* podem causar diversos tipos de infecções com amplo espectro de apresentações clínicas, desde formas superficiais benignas até invasivas, que comprometem diversos órgãos podendo levar o hospedeiro a morte (YANG, 2003).

Existem aproximadamente 200 espécies diferentes de *Candida*, e cinco dessas espécies, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Subdivididas em *C. parapsilosis*; *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) estão envolvidas em mais de 90% dos casos de infecções invasivas (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; BUTLER, 2010). As outras espécies emergentes de *Candida*, como a *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. inconspícua*, também têm alta relevância clínica, as quais têm sido identificadas como agentes causadores de micoses superficiais e sistêmicas (PFALLER et al., 1995; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; GÓMEZ et al., 2010).

Dentre as espécies de *Candida*, *C. albicans* é considerada a espécie mais frequentemente isolada de pacientes com infecções superficiais e invasivas, em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todo o mundo (ZICKER et al., 2011; NGUYEN et al., 2012). Apresenta como principais mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência, a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases. Esta espécie é naturalmente sensível aos antifúngicos de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida aos azólicos, particularmente ao fluconazol, têm sido descritos em pacientes que recebem terapia prolongada (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Em países de América Latina, particularmente o Brasil, *C. tropicalis* é encontrada com frequência de 20 a 24% das infecções hematogênicas (NUCCI & COLOMBO, 2007; PFALLER & DIEKEMA, 2007), principalmente em pacientes neutropênicos e em outras condições como diabetes mellitus e em pacientes idosos (SIPSAS et al., 2009). Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e aos triazólicos (GODOY et al., 2003), no entanto, casos de resistência a esses medicamentos, principalmente ao fluconazol, tem sido recentemente descritos encontrados (ALMEIDA et al., 2013, JIANG et al., 2012).

*C. glabrata* e *C. krusei*, também são espécies com potencial patogênico (NUCCI & COLOMBO, 2007; PFALLER & DIEKEMA, 2007). A *C. glabrata* ocupa o segundo lugar entre as espécies isoladas de infecções hematogênicas nos EUA (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Também tem-se observado aumento da porcentagem de isolados resistentes ao fluconazol e com resistência cruzada a outros medicamentos da classe dos azóis, além de menor sensibilidade à anfotericina B (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

*C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol (GOLDMAN et al., 1993) e tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e ou submetidos a transplante de medula óssea (GOLDMAN et al., 1993; PFALLER et al., 2007).

*C. parapsilosis* tem sido isolada das mãos de profissionais de saúde e soluções de nutrição parenteral (TROFA et al., 2008). Essa levedura tem sido reconhecida como uma das principais causas de candidemia relacionado às infecções com foco originado na pele (BRITO et al., 2006). Em geral, isolados clínicos desta espécie são sensíveis à maioria dos antifúngicos, principalmente anfotericina B e azóis. No entanto, foram relatados em isolados clínicos casos de sensibilidade reduzida ao fluconazol (ASBECK et al., 2007, SARVIKIVI et al., 2005).

As espécies de *Candida* apresentam grande relevância clínica devido à incidência de colonização e infecção no organismo humano. Assim sendo, faz-se necessário identificar e diagnosticar corretamente a espécie de levedura responsável pelas infecções e também prescrever um antifúngico para o tratamento correto.

### **3. Identificação e caracterização molecular**

Nas últimas décadas, técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas para compreender a patogenicidade das espécies de *Candida*, bem como a busca de novos



alvos moleculares para as drogas. As espécies de *Candida* são diplóides, heterozigóticas e apresentam genoma plasticial, e a abordagem genômica permitiu que essas propriedades fossem caracterizadas de maneira mais eficaz. Em 1996, iniciou o *Candida Genome Sequencing Project* cujo principal objetivo era sequenciar o genoma de *C. albicans* SC5314 (JONES et al., 2004; BRAUN et al., 2005), para tanto foi necessário o uso de ferramentas de bioinformática (software específicos) que possibilitam a predição e anotação dos genes encontrados. Nesse projeto foram descritos 6.354 genes, entretanto algumas sequências de DNA, de cromossomos específicos não foram determinados.

A comparação do genoma da *C. albicans* com outros genomas de diferentes espécies de fungos permitiu a identificação de vários genes específicos, que eventualmente poderiam ser alvo para terapia com antifúngicos. Observaram que, em comparação com outros fungos, as sequências codificadoras do genoma de *C. albicans* eram ricas em repetições de sequências curtas (STR, Short Tandem Repeats). Também foi possível a identificação e análise detalhada das várias famílias multigênicas encontradas nesta espécie, muitas delas relacionadas com a patogenicidade (BRAUN et al., 2005).

Em 2007, Van Het Hoog et al. (2007) forneceram a sequência completa do genoma de *C. albicans* SC5314 (15,845 Mb, organizado em 8 cromossomos. Além de sua utilidade para o mapeamento genético, revelou algumas características biológicas, incluindo: 1) mais uma família de genes que codifica fator de transcrição; 2) informações sobre as relações de localização cromossômica para famílias de genes semelhantes; 3) uma revisão da lista de *open reading frame* (ORF) realizada anteriormente por Braun et al. (2005).

Com o objetivo de determinar as características genéticas subjacentes à diversidade biológica e patogênica das diferentes espécies de *Candida*, Butler et al. (2009) propuseram o sequenciamento de *C. albicans* (WO-1), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *Lodderomyces elongisporus* (parente próximo da *C. parapsilosis*), e posterior comparação com o isolado já sequenciado de *C. albicans* SC5314 e *Debaryomyces hansenii*, levedura marinha raramente associada com doença, (DUJON et al., 2004, JONES et al., 2004, BRAUN et al., 2005; VAN HET HOOG et al., 2007).

Os genomas das espécies estudadas por Butler et al. (2009), variaram em tamanho (entre 10,6 a 15,5 Mb) e composição de genes codificadores de proteínas (entre 5.733 a 6.318 genes) de acordo com as espécies. Também identificaram 64 famílias gênicas que mostraram ter alguma relação com a patogenicidade das espécies de *Candida*. Seis dessas famílias já tinham sido anteriormente associadas com a patogenicidade, incluindo o gene ERG3, envolvido na via de biossíntese de ergosterol (BUTLER et al., 2009). A divulgação dos genomas de *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* (CNCA) para o domínio público acelerou a pesquisa na elucidação dos mecanismos biológicos e principalmente mecanismos moleculares associados com a patogenicidade dessas espécies.

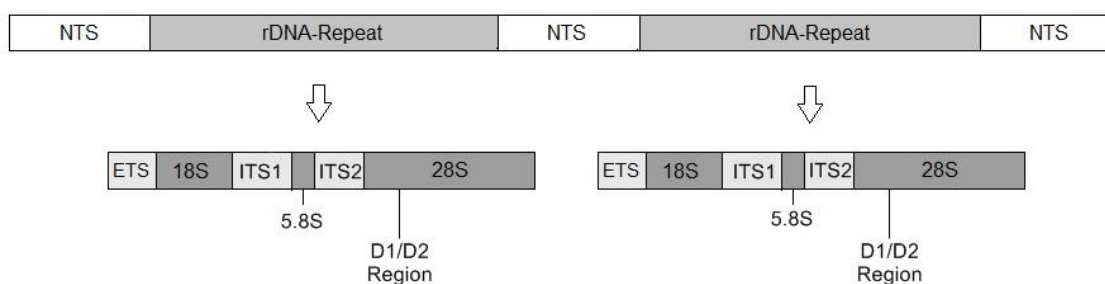
Devido algumas das espécies de leveduras do gênero *Candida* apresentar poucas variações morfológicas e bioquímicas, técnicas de biologia molecular tem sido utilizada para superar as limitações dos métodos de identificação fenotípicos. A sistemática molecular de fungos se baseia principalmente na análise dos genes do DNA mitocondrial (mDNA) e DNA ribossomal (rDNA) (BRIDGE et al., 2005).

O gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) foi proposto para identificação molecular em nível de espécie (HEBERT et al., 2003) e é o marcador padrão adotado pelo *Consortium for the Barcode of Life* para todos os grupos de organismos, incluindo fungos (SCHINDEL & MILLER., 2005). O COI funciona razoavelmente bem como um código de barras em alguns gêneros de fungos, como o *Penicillium* (SEIFERT et al., 2007), no entanto os resultados em alguns outros grupos examinados experimentalmente são inconsistentes, delimitando a utilização do mesmo (DENTINGER et al., 2011).

Os genes ribossomais são conservados entre todos os grupos de organismos conhecidos. Como consequência, esse gene permite a reconstrução da filogenia conjunta de procariotos e eucariotos. Além disso, a taxa de substituição de nucleotídeos no 18S rDNA é baixa (SIMON et al., 1993). Por outro lado, essas características impedem muitas vezes a discriminação de espécies próximas. Assim, espécies que apresentam diferenças ao nível dos genes ribossomais provavelmente já divergiram há pelo menos alguns milhões de anos.

Para discriminação de espécies próximas de fungos filamentosos e leveduras, as regiões ITS 1 e 2 (Internal transcribed spacer), localizadas entre os genes 18S, 5.8S e 28S do rDNA e a região D1/D2 localizada na subunidade maior do rDNA, têm

demonstrado eficiência na utilização da identificação em nível de espécie (Figura 1). Nas regiões ITS 1 e 2 ocorrem repetições em *tandem* de 100-200 cópias, as quais contêm domínios altamente conservados e domínios variáveis, respectivamente (ENACHE- SOARE et al., 2009; SHOKOHI et al., 2010). Essas regiões têm sido adotadas como código de barras para a maioria dos gêneros de fungos, sendo considerado marcador padrão pelo *Consortium for the Barcode of Life* (SCHOCH et al., 2012).



**Figura 1.** Estrutura do rDNA de fungos. NTS: *Non-transcribed spacer*, ETS: *External transcribed spacer*, ITS: *Internal transcribed spacer*, D1/D2 Region: Região D1/D2, genes 18S, 5.8S e 28S do DNA ribossomal.

Kurtzman et al. (2007) descreveram a existência de divergências extensas na região D1/D2 que permitiu a diferenciação de *Ascomycetos*. Desde então, essas regiões em conjunto com as regiões ITS tem sido amplamente utilizada para a identificação e estabelecimento das relações evolutivas (Filogenia) de diversas espécies de fungos, incluindo *Candida* spp. A filogenia inferida por dados moleculares tem sido utilizada para esclarecer as principais linhas evolutivas, e tem auxiliado no processo de identificação de grupos taxonômicos superiores, incluindo o reino Fungi (BRIDGE et al., 2005).

A história evolutiva contada pela análise filogenética é normalmente ilustrada como ramificações, diagramas em formato de árvore que representa a estimativas das relações herdadas entre moléculas (“árvores genéticas”), organismos ou ambos (BRINKMAN & LEIPE, 2001). Existem três classes principais de métodos filogenéticos: baseados em distâncias, baseados em caracteres, e baseado na inferência bayesiana. Nos modelos que utilizam distâncias para a reconstrução

filogenética, duas etapas são necessárias: cálculo da distância e a construção da topologia.

Para o cálculo da distância são utilizadas matrizes calculadas a partir de comparações par a par das sequências alinhadas, tendo como base um modelo de substituição, isto é, um modelo de evolução das sequências (Russo et al., 2012). Dentre os mais utilizados para análise filogenética em espécies de *Candida* estão: Distância P, Jukes-Cantor, Kimura 2-Parâmetros, Tajima e Nei, Tamura 3-Parâmetros, Tamura e Nei, Gama-Poisson, e Distância PAM. Os algoritmos utilizados procuram ordenar, na topologia, as distâncias calculadas entre as sequências macromoleculares constantes na matriz, sendo os mais utilizados UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic means), Neighbor-joining e Minimum evolution (Russo et al., 2012).

Os modelos baseados em caracteres, são diretamente inspirados nos métodos da cladística (Máxima parcimônia e Máxima Verossimilhança) (Pereira et al., 2012), e os modelos baseado na inferência bayesiana, os parâmetros são considerados variáveis aleatórias nas quais a incerteza sobre valores é medida pela distribuição da probabilidade posterior (Huelsenbeck & Ronquist, 2005).

Para caracterização molecular de *Candida spp.* são utilizados diversas técnicas, tais como *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (CARDONA-CASTRO et al., 2002), *fingerprinting* de DNA (PUJOL et al., 2002), *electrophoretic karyotyping* (RHO et al., 2004), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (PINTO et al., 2004), *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) (BORIOLLO et al., 2006) e microssatélites (SAMPAIO et al., 2009). No entanto, para estimar distâncias genéticas e inferir a relação filogenética das espécies podendo ser facilmente avaliada em termos de modelos de probabilidade, as técnicas mais indicadas são as baseadas no sequenciamento de genes, em que pode-se avaliar topologias construídas a partir de nucleotídeos ou de aminoácidos no caso de se utilizar genes codificadores.

O *Multilocus Sequence Typing* (MLST), método baseado em sequenciamento, foi inicialmente desenvolvido para a identificação de clones e tipagem bactérias patogênicas (MAIDEN et al., 1998). O método analisa polimorfismos de nucleotídeos em fragmentos de genes essenciais “housekeeping genes” de até 500pb detectados por meio de sequenciamento molecular (MAIDEN et al., 1998; BOUGNOUX et al., 2002; ODDS & JACOBSEN 2008), possibilitando a caracterização molecular com alto poder discriminatório e reprodutibilidade.

A técnica de MLST foi descrita para diferentes espécies de *Candida* (<http://www.mlst.net/>), entre elas *C. albicans* no início de 2000 (BOUGNOUX et al., 2002; TAVANTI et al., 2003). Com base em um trabalho colaborativo, um conjunto de sete genes essenciais de *C. albicans* foi proposto para análises (BOUGNOUX et al., 2003). Este conjunto inclui os genes: AAT1a, ACC1, ADP1, MPIB, SYA1, VPS13 e ZWF1b, sendo que em 2007 o gene MPIB foi renomeado e passou a ser chamado de PMI1 (ARNAUD et al., 2007). O MLST provou ser um método útil para a diferenciação epidemiológica de isolados clínicos de *C. albicans* (BOUGNOUX et al., 2002; TAVANTI et al., 2003).

Dodgson et al. (2003) desenvolveram MLST para *C. glabrata* por meio da amplificação e sequenciamento de fragmentos de regiões de codificação de 6 genes (FKS , LEU2 , NMT1 , TRP1 , UGP1 e URA3 ), o método diferenciou 30 DSTs (Diploid Sequence Type). Ainda não foram encontrados estudos que correlacionem DSTs em *C. glabrata* com a resistência aos antifúngicos. Uma análise por MLST de 230 isolados de *C. glabrata* de cinco populações que diferiam tanto geograficamente quanto temporalmente confirmou que a partir dos seis loci, foi possível obter a diversidade genotípica e diferenciação entre os isolados desta espécie (LOTT et al., 2010).

Tavanti et al. (2005) descreveram alto grau de reprodutibilidade para diferenciar por MLST isolados de *C. tropicalis* por meio de fragmentos polimórficos de seis genes (MDR1, ICL1, SAPT2, SAPT4, XYR1 e ZWF1a) com poder discriminatório acima de 99%. O método diferenciou 87 tipos de sequências diplóides DSTs entre o total de 106 isolados testados. Jacobsen et al. (2008) realizaram um estudo da filogenia molecular por MLST em 242 isolados de *C. tropicalis* e a análise haplótipica revelou diversos eventos de recombinação, descreveram alguns eventos de diferenças causadas por completa de heterosigose.

Ao realizar um estudo de caracterização molecular com 61 isolados de *C. tropicalis*, Magri et al. (2013) encontraram apenas 3 isolados resistentes ao fluconazol, não sendo possível as análises de correlação de DSTs com a resistência. Esses mesmos autores, relataram que o MLST é importante ferramenta para o estudo da diversidade genética, principalmente no que diz respeito aos polimorfismos. Embora muitos estudos moleculares tenham sido realizados para analisar as diferentes espécies de *Candida*,

mais pesquisas são necessárias para investigar a diversidade genética, filogenética e epidemiologia de *Candida spp.*

#### **4. Antifúngicos e mecanismos de resistência**

As classes de medicamentos mais comumente utilizadas para combater as infecções causadas por *Candida spp.* são os polienos (anfotericina B e nistatina), análogos de pirimidina (flucitosina), os azóis (fluconazol, Itraconazol, e voriconazol) e as equinocandinas (caspofungina, anidufungina e micafungina). As resistências aos agentes antifúngicos podem ser intrínsecas ao organismo, ou serem resultantes da utilização extensiva do medicamento em profilaxia ou tratamento das infecções fúngicas (DA MATTA et al., 2007).

Tipicamente, a resistência pode ser atribuída a mutações e aumento da expressão de genes ou famílias multigenicas que codificam proteínas do tipo ABC (ATP-binding cassette), enzimas responsáveis pela biossíntese do ergosterol e glucana, e fatores transcritpcionais como relatados na Tabela 1 (BARKER & ROGERS, 2006).

**Tabela 1.** Genes associados com a resistência antifúngica em espécies clinicamente relevantes de *Candida*

Classes das moléculas	Genes	Localização dos Genes	Alteração	Espécies	Classes de antifúngicos	Referência
Proteínas transportadoras do tipo ABC	CDR1	Chr 3	Superexpressão	<i>C. albicans</i>	Azóis	Holmes et al., 2006
	CDR2	Chr 3	Superexpressão	<i>C. albicans</i>	Azóis	Sanglard et al., 1997
Complexo enzimático da Biossíntese do Ergosterol	ERG2	Chr 1	Mutação Pontual	<i>C. glabrata</i>	Polienos	Hull et al., 2012
	ERG3	Chr 1	Mutação Pontual	<i>C. albicans</i>	Azóis	Sanglard et al., 2003
	ERG6	Chr 3	Mutação Pontual	<i>C. glabrata</i>	Polienos	Vandeputte et al., 2008
	ERG11	Chr 5	Superexpressão Mutação Pontual	<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. tropicalis</i>	Azóis	Carvalho et al., 2013 Eddouzi et al., 2013 Geber et al., 1995 Jiang et al., 2012 Lamping et al. 2009 Perea et al., 2002
Complexo enzimático da Biossíntese da glucana	FKS1	Chr 1	Mutação Pontual	<i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i>	Equin	Zimbeck et al., 2010 Kahn et al., 2007
	FKS2	Chr R	Mutação Pontual	<i>C. glabrata</i>	Equin	Zimbeck et al., 2010
Fatores transcriptacionais	UPC2	Chr 1	Desconhecido	<i>C. albicans</i>	Azóis	Heilmann et al., 2010
	TAC1	Chr 5	Mutação Pontual	<i>C. albicans</i>	Azóis	Coste et al., 2004
	PDR1	Chr A	Mutação Pontual	<i>C. glabrata</i>	Azóis	Tsai et al., 2010
	MRR1	Chr 3	Mutação Pontual	<i>C. albicans</i>	Azóis	Dunkel et al., 2008
Proteína transportadora de membrana MFS	MDR1	Chr 6	Superexpressão	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i>	Azóis	Chau et al 2004 Akins., 2005
Outros	PDH1	Chr F	Superexpressão	<i>C. glabrata</i>	Azóis	Izumikawa et al., 2003
	PDR16	Chr 1	Superexpressão	<i>C. albicans</i>	Azóis	Saidane et al., 2006
	FCY1	Chr 6	Mutação Pontual	<i>C. lusitaniae</i>	Análogos de Pirimidina e Azóis	Florent et al., 2009
	FCY2	Chr 3	Mutação Pontual	<i>C. lusitaniae</i>	Análogos de Pirimidina e Azóis	Florent et al., 2009
	FCY22	Chr 2	Mutação Pontual	<i>C. albicans</i>	Análogos de Pirimidina	Chapeland-Leclerc et al., 2005
	FCA1	Chr 6	Mutação Pontual	<i>C. albicans</i>	Análogos de Pirimidina	Hope et al. 2004
	FUR1	Chr 5	Mutação Pontual	<i>C. albicans</i>	Análogos de Pirimidina	Hope et al. 2004

ABC: *ATP-binding cassette*; MFS: *Major Facilitator Superfamily*; Chr R, 1, 2, 3, 5 e 6: Localização do Cromossomo baseado no genoma completo de *C. albicans* SC5314; Chr A e F: Localização do Cromossomo baseado no genoma completo de *C. glabrata* CBS138; Equin: Equinocandinas; C. : *Candida*.

#### **4.1. Polienos**

A anfotericina B é um dos antifúngicos mais antigos da classe dos polienos e é considerada a droga de referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas sistêmicas. A anfotericina B atua ligando-se aos esteróis da membrana celular, resultando em um extravasamento dos constituintes celulares e morte celular (Figura 2). Seu espectro de ação inclui todas as espécies de *Candida*, algumas espécies de *Aspergillus*, *Blastomyces dermatitidis*, entre outros fungos. Essa droga não é absorvida pelo trato gastrointestinal e deve ser administrada por via intravenosa com supervisão hospitalar (BATISTA et al., 1999).

Os mecanismos de resistência desta classe ainda não foram elucidados, no entanto admite-se que alterações dos esteróides da membrana celular e do perfil fosfolípídico dos esteróis, defesa contra os danos oxidativos e mutações nos genes envolvidos na biossíntese do ergosterol, principalmente no gene ERG6, possam estar relacionadas a resistência em espécies de *Candida* (PEREA & PATTERSON 2002).

Vandeputte et al. (2008) identificaram uma mutação pontual sem sentido ou *nonsense* (que codificam um códon de parada) no gene ERG6 (Ergosterol Biosynthesis) que levou a diminuição do teor ergosterol em um isolado clínico de *C. glabrata* resistente a anfotericina B (Tabela 1). Hull et al. (2012) identificaram duas mutações (T121V e T121I) no gene ERG2 (Ergosterol Biosynthesis) em dois isolados de *C. glabrata* com sensibilidade reduzida a anfotericina B. Essa substituição de treonina na posição 121 por valina ou isoleucina comprometeu a função do gene ERG2, promovendo a diminuição da sensibilidade dos isolados a anfotericina B (Tabela 1).

#### **4.2. Análogos de Pirimidina**

A flucitosina, 5-fluorocitosina ou 5-FC, é uma pirimidina que transforma-se, dentro da célula fúngica, em 5-fluoruracil e depois em 5-fluordesoxiuridina. Esse último comporta-se como um antimetabólito que interfere na biossíntese normal dos ácidos nucléicos e nucleotídeos vitais para o crescimento do fungo (Figura 2), são indicados para o tratamento de infecções causadas principalmente por *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., *Torulopsis* spp. e *Aspergillus* (VERMES et al., 2000).

Mutações que causam a quebra ou diminuição no importe do fármaco ou na sua conversão intracelular são frequentemente responsáveis pela resistência aos análogos da pirimidina. O mecanismo de resistência mais frequente são mutações no gene FUR1 (5-



Fluorouridine Resistant), que codifica para a enzima responsável pela conversão intracelular da 5-FU (5-fluorouracil) em metabolitos capazes de integrar o metabolismo da citosina. A mutação pontual que resultou na troca de arginina por cisteína na posição 101 no gene FUR-1 foi associada por Hope et al. (2004) com a resistência a 5-FC em *C. albicans* (Tabela 1).

Outra mutação frequentemente associada apenas à resistência da 5-FC é uma mutação no gene FCY1 (Fluorocytosine Resistance 1), que codifica para a citosina desaminase, responsável pela conversão de 5-FC em 5-fluorouridina monofosfato, desregulando a via biossintética das pirimidinas (CHAPELAND-LECLERC et al., 2005; PAPON et al., 2007). Florent et al. (2009) identificaram a mutação T26C a qual resultou na alteração aminoacídica M19T, no gene FCY1 associada a resistência de *C. lusitane* a 5-FC.

### **4.3. Azóis**

Os azóis tem amplo espectro de ação, por isso, constituem a classe de medicamento mais utilizada no tratamento de doenças causadas por fungos, especialmente por *Candida spp.* O ergosterol é um componente essencial para manter a integridade e função da membrana plasmática dos fungos e é alvo para muitos antifúngicos, incluindo os azóis. Esta via biossintética converte ácido acético em ergosterol utilizando diversas enzimas, similar o que ocorre na biossíntese de colesterol em mamíferos.

O fluconazol, voriconazol, itraconazol e posaconazol atuam na via biossintética do ergosterol da membrana fúngica, por meio da inibição da enzima 14 $\alpha$ -demetilase (Erg11p ou 14DM), sendo citocromo P450 dependente. Dessa forma, a conversão de lanosterol em ergosterol é impedida, aumentando a permeabilidade e progressiva instabilidade da célula fúngica (VANDEPUTTE et al., 2005; BARKER & ROGERS, 2006) (Figura 2).

Diversos estudos têm sido realizados para elucidação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de resistência aos azóis em isolados clínicos das espécies de *Candida*. Um dos mecanismos apontados envolve as bombas de efluxo, as quais exportam o antifúngico do meio intracelular para o meio extracelular, reduzindo assim a sua concentração intracelular (SANGLARD et al., 1997; HOLMES et al., 2006).

Estudos realizados com o fluconazol demonstraram que este medicamento é ativamente transportado ao meio externo pelas células fúngicas de maneira dependente de energia, e que o maior efluxo do antifúngico é causado pela superexpressão de genes que codificam proteínas transportadoras de membrana (SANGLARD et al., 1997; MORSCHHAUSER, 2002; HOLMES et al., 2006).

Duas famílias de transportadores de membranas de efluxo podem ser distinguidas em leveduras de acordo com a fonte de energia utilizada para a extrusão de substratos (MARIE & WHITE, 2009). Os genes CDR1 e CDR2 (*Candida Drug Resistance*) codificam proteínas transportadoras do tipo ABC (ATP-binding cassette) que atuam como bombas de efluxo transmembranares e utilizam a hidrólise de ATP para encaminhar os substratos através da membrana. A expressão dos genes CDR1 e CDR2 é regulada pelo fator de transcrição Tac1 (Transcriptional Activator of CDR genes). A hiperativação do fator de transcrição Tac1 é conferida por mutações *gain-of-function* que conseqüentemente promovem a superexpressão dos genes CDR1 e CDR2 (COSTE et al., 2004).

Além dos genes CDR1 e CDR2, o gene MDR1 (Multi Drug Resistance 1) codifica a proteína do tipo MFS (Major Facilitator Superfamily), pertencente à superfamília das permeases, que atua como transportadora de membrana e utiliza gradiente eletroquímico de prótons para o transporte de substratos, estando diretamente envolvida na resistência ao fluconazol. A expressão do gene MDR1 é regulada por pelo menos por três fatores de transcrição, entre eles, o mais descrito, o fator de transcrição MRR1 (Multidrug Resistance Regulator 1). A hiperativação do fator MRR1 é conferida por mutações *gain-of-function* em *C. albicans* e *C. dubliniensis* (Tabela 1) conferindo a superexpressão do gene MDR1 (SCHUBERT et al., 2008).

Alterações na biossíntese do ergosterol é outro mecanismo de resistência. Este mecanismo passa pela inativação da enzima esterol  $\Delta 5,6$ -desaturase (codificada pelo gene ERG3) que atua na etapa anterior à lanosterol  $14\alpha$ -demetilase na via da biossíntese do ergosterol, convertendo  $14\alpha$ -metilfecosterol em  $14\alpha$ -metil-3,6-diol. Como o esterol  $14\alpha$ -metilfecosterol é capaz de suportar o crescimento da célula fúngica e  $14\alpha$ -metil-3,6-diol é tóxico para a célula, a inativação do esterol  $\Delta 5,6$ -desaturase promove a resistência aos azóis (CHAU et al., 2005). Desse modo, alterações nessa etapa enzimática, apresentam vantagem seletiva quando submetidas à ação dos azóis (AKINS, 2005).

As mutações no gene ERG11 em *Candida* spp. (localizado no cromossomo 5, com variação no tamanho em pares de bases ‘pb’ de acordo com a espécie, de 1569 pb para *C. parapsilosis* a 2669 pb para *C. glabrata*) também estão envolvidas com mecanismos de resistência. Essas mutações conferem resistência aos azóis pela diminuição da afinidade de ligação do fármaco determinando o aparecimento de leveduras com fenótipo resistente aos azólicos (BARKER & ROGERS, 2006). Diversos estudos compararam a sequência do gene ERG11 de isolados de diferentes espécies de *Candida* sensíveis e resistentes aos azóis, sendo a *C. albicans* a espécie mais estudada (CHAU et al., 2004; GOLDMAN et al., 2004; CARVALHO et al., 2013).

Ao estudar isolados de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol, Vandeputte et al. (2005) encontraram uma mutação de não sinônima (Y132F) que havia sido relatada anteriormente em *C. albicans* por Chau et al., 2004 conferindo resistência a esse fármaco. Carvalho et al. (2013) ao investigar mutações no gene ERG11 em isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* previamente avaliados por testes de susceptibilidade ao fluconazol, identificaram 14 diferentes mutações missense, cinco das quais não tinham sido descritas anteriormente, sendo que uma nova mutação L321F foi identificada em um isolado de *C. albicans* resistente ao fluconazol.

O aumento da expressão do gene ERG11 também resulta na resistência aos antifúngicos, pois este implica na elevação da concentração da 14 $\alpha$ -demetilase no ambiente intracelular, necessitando de maiores quantidades de antifúngico para inibir a atividade da enzima. Este mecanismo tem sido encontrado em vários isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (PEREA et al., 2002; GOLDMAN et al., 2004). A expressão do gene ERG11 é regulada pelo fator de transcrição Upc2. Em resposta aos agentes azólicos, foram identificadas mutações no gene UPC2 (UPtake Control), designadas de mutações *gain-of-function*, que são responsáveis pela sua hiperatividade. Esta hiperatividade conduz à ativação da expressão do gene ERG11. A sobre-expressão do ERG11 reduz significativamente o efeito do antifúngico nas células, diminuindo a sua sensibilidade (HEILMANN et al., 2010).

#### **4.4. Equinocandinas**

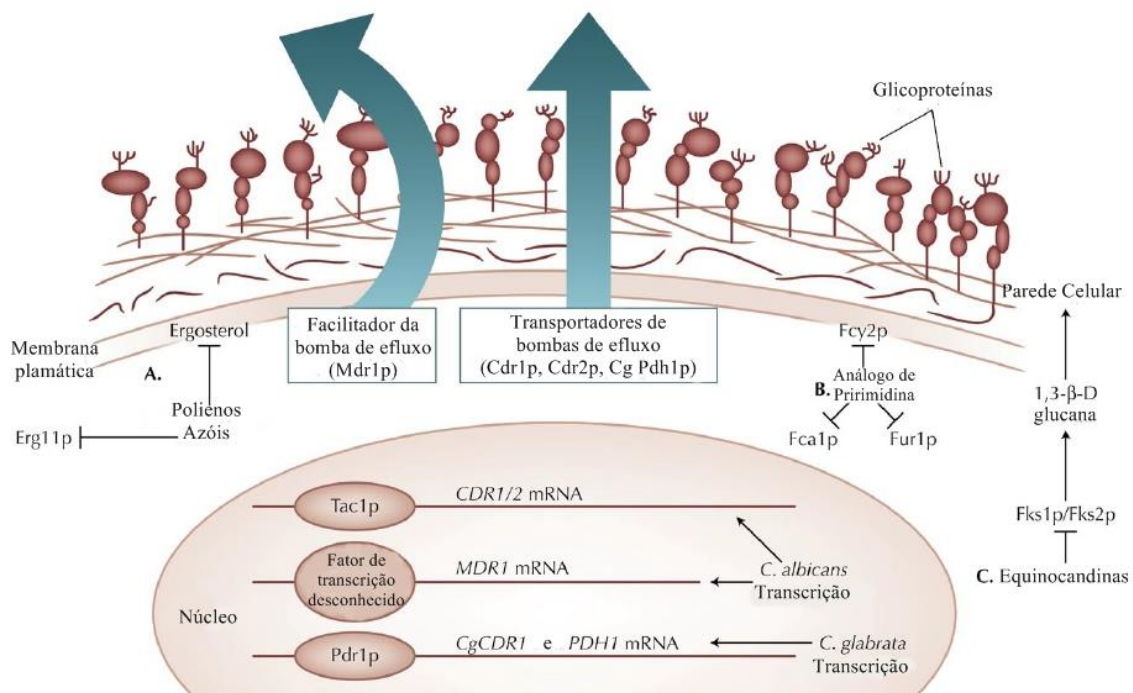
A equinocandina é classe mais recente de agentes antifúngicos que foi introduzida na prática clínica para o tratamento de infecções causadas por espécies fungos, especialmente do gênero *Candida* (CAPPELLETY & EISELSTEIN-

MCKITRICK, 2007). As três drogas antifúngicas: caspofungina, micafungina e anidulafungina, têm-se mostrado eficaz no tratamento de candidíase (PFALLER, 2004; DERESINSKI & STEVENS, 2003; CHANDRASEKAR & SOBEL, 2006). Essas drogas inibem a  $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintetase, que é responsável pela síntese da parede celular de fungos e composta de um complexo de proteínas e polícarboidratos. O bloqueio desta enzima provoca instabilidade osmótica comprometendo a integridade da membrana dos fungos levando-os à morte (MORRIS & VILLMANN, 2006). Esse mecanismo também está ilustrado na Figura 2.

Embora a utilização das equinocandinas no tratamento seja recente, já foram descritas resistências a este fármaco. A diminuição da sensibilidade para as equinocandinas tem sido associada a mutações nas subunidades Fks1p e Fks2p do complexo  $\beta$ -1,3-glucano sintetase, o qual é necessário para a produção de  $\beta$ -1,3 glucano, componente essencial da parede celular das espécies de *Candida* (DESNOS-OLLIVIER et al., 2008 ).

Especificamente, as mutações ocorrem em duas regiões, *hot spot 1* e *hot spot 2*, de nove e oito aminoácidos respectivamente, que aparecem em ambos os genes. Estas mutações nos genes FKS1 e FKS2 (FK506 Sensitivity Protein 1) resultaram na incapacidade das equinocandinas inibir a produção de 1,3- $\beta$ - glucana (PERLIN, 2007). Mutações no *hot spot 1* dos genes FKS1 e FKS2 são as mais prevalentes em uma variedade de espécies de fungos resistentes a este fármaco. Zimbeck et al (2010) relataram mutações no *hot-spot1* de ambos os genes, FKS1 e FKS2, associadas a *C. glabrata* resistentes a equinocandinas (Tabela 1).

O sequenciamento dos genomas de algumas espécies de *Candida* possibilitou elucidar alguns dos mecanismos referentes à resistência intrínseca ou adquirida por leveduras do gênero *Candida*. A comunidade científica vem desenvolvendo estratégias para entender e solucionar o problema referente à resistência, e uma das alternativas é as prospecções novas de moléculas bioativas com atividade antifúngica baseadas na caracterização genética e molecular dos isolados, podendo oferecer além de viabilidade sócio-econômica, tecnológica e industrial, e tratamento apropriado baseado na melhor especificidade da atividade de novas moléculas, principalmente nos casos de emergência de isolados resistentes.



**Figura 2.** Mecanismo de ação e resistências aos antifúngicos em espécies de *Candida*. A) Biossíntese do ergosterol (azóis) e integridade da membrana plasmática (polienos), alterações dos esteroides da membrana celular e do perfil fosfolipídico dos esteróis, defesa contra os danos oxidativos e mutações nos genes (ERG11 que codifica a 14 $\alpha$ -demetilase) envolvidos na biossíntese do ergosterol pode levar resistência. B) Biossíntese dos ácidos nucleicos e nucleotídeos (análogos de pirimidina), mutações (gene FCY2, FUR1 e FCA1 que codificam Fcy2p, Fur1p e Fca1p, respectivamente) que causa a quebra ou diminuição no importe do fármaco ou na sua conversão intracelular são frequentemente responsáveis pela resistência. C) Manutenção da parede celular (equinocandinas), a resistência está associada a mutações nas subunidades Fks1p e Fks2p do complexo  $\beta$ -1,3-glucano sintetase, o qual é necessário para a produção de 1,3- $\beta$ -D glucana, componente essencial da parede celular das espécies de *Candida*.

**Fonte:** Adaptado de BARKER & ROGERS, 2006.

## Referências

Akins R. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. Medical Mycology 2005;43:185:318.

Almeida AA, Mesquita CSS, Svidzinski TIE, Oliveira KMP. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates in the University Hospital in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso) 2013; 46:335-339.

Arnaud MB, Costanzo MC, Skrzypek MS, Shah P, Binkley G, Lane C, Miyasato SR, Sherlock G. Sequence resources at the *Candida* genome database, Nucleic Acids Research 2007; 35(1): D452–D456.

Asbeck EC, Huang Y, Markham AN, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia* 2007; 164:287-293.

Baixench MT, Aoun N, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Ramires, S, Piketty C, Dannaoui E. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59(6): 1076-83.

Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase. *Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, Rio de Janeiro 2010; 22(1):22-38.

Barker SKP, Rogers DP. Recent Insights into the Mechanisms of Antifungal Resistance. *Fungal Infections* 2006;8:449–456.

Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida Albicans* Isoladas de pacientes com estomatite protética. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo* 1999; 13(4):343-348.

Braun BR, Van Het Hoog MVH, D'enfert C, Martchenko M, Dungan J, Kuo A, Inglis DO, Uhl MA, Hogues H, Berriman M, et al. A Human-Curated Annotation of the *Candida albicans* Genome. *Plos One Genetics* 2005; 1(1):36-57.

Bridge PD, Spooner BM, Roberts PJ. The impact of molecular data in fungal systematic. *Advances in Botanical Research* 2005; 42:34-68.

Brinkman FS, Leipe DD. Phylogenetic analysis. *Methods Biochem Anal* 2001; 43:323-58.

Brito LR, Guimaraes T, Nucci M, Rosas RC, Paula Almeida L, Da Matta DA, Colombo AL. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology* 2006; 44(3):261-266.

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*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 64, p. 346-365, 2006.

Bougnoux ME, Morand S, D'enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(4):1290–1297.

Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, Gow NA, Magnier A, Davidson AD, Maiden MC, D'enfert C, Odds FC. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(11):5265–5266.

Butler G. Fungal Sex and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 2010; 23(1):140-159.

Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Akthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 2009; 459:657–662.

Cappelletty D, Eiselstein-Mckitrick K. The echinocandins. *Pharmacotherapy* 2007; 27:369-388.

Cardona-Castro N, Revankar SG, Ortiz P, Cuervo C, Kirkpatrick WR, Mcatee RK, Petterson TF. Proteinase detection, DNA typing and antimycotic susceptibility of *Candida* isolates from Colombian women with vulvovaginal candidiasis. *Rev Iberoam Micol.*2002; 19(2):89-94.

Carvalho VO, Okay TS, Melhem MSC, Szeszs MW, Del Negro GMB. The new mutation L321F in *Candida albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance. *Rev Iberoam Micol.*2013; 30(3):209–212.

Chandrasedhar PH, Sobel JD. Micafungin: a new echinocandin. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 42:1171-1178.

Chapeland-Leclerc F, Bouchoux J, Goumar A, Chastin C, Villard J, Noël T. Inactivation of the FCY2 gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother*2005; 49:3101-8.

Chau AS, Gurnani M, Hawkinson R, Laverdiere M, Cacciapuoti A, McNicholas P. Inactivation of sterol Delta5,6-desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(9):3646-51.

Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas, P. Application of Real-Time Quantitative PCR to Molecular Analysis of *Candida albicans* Strains Exhibiting Reduced Susceptibility to Azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(6): 2124–2131.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003; 36(5):599-607.

Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. Tac1, Transcriptional Activator of CDR Genes, Is a New Transcription Factor Involved in the Regulation of *Candida albicans* ABC Transporters, *Eukaryot. Cell* 2004;3(6):1639–1652.

Da Matta DA, De Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, Salomão R, Colombo AL. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; 57(4):399-404.

Dentinger BTM, Didukh MY, Moncalvo JM. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina). *PLoS One* 2011; 6:1-8.

- Deresinski SC, Stevens DA. Caspofungin. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 36:1445-1457.
- Desnos-Ollivier M, Ragon M, Robert V, Raoux D, Gantier JC, Domer F. *Debaryomyces hansenii* (*Candidafamata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *J. Clin. Microbiol* 2008; 46:3237-324.
- Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus Sequence Typing of *Candida glabrata* Reveals Geographically Enriched Clades. *J. Clin. Microbiol* 2003; 41(12):5709–5717.
- Dunkel, N.; Liu, T. T.; Barker, K. S.; Homayouni, R.; Morschhäuser, J.; Rogers, P. D. A Gain-of-Function Mutation in the Transcription Factor Upc2p Causes Upregulation of Ergosterol Biosynthesis Genes and Increased Fluconazole Resistance in a Clinical *Candida albicans* Isolate. *Eukaryot. Cell* 2008; 7(7):1180–1190.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola I, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, et al. Genome evolution in yeast. *Nature* 2004; 430:35–44.
- Eddouzi J, Parker JE, Vale-Silva LA, Coste A, Ischer F, Kelly S, Manai M, Sanglard D. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Clinical *Candida* Species Isolated from Tunisian Hospitals *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(7):3182–3193.
- Enache-Soare S, Pelinescu D, Ionescu R, Avram I, Stoica I, Vassu-Dimov T. Molecular identification of some yeast strains involved in oral candidosis. *Romanian Biotechnological Letters* 2009; 14(1):4180-4186.
- Florent M, Noël T, Robert GR, Da Silva B, Fitton-Ouhabi V, Chastin C, Papon N, Chapeland-Leclerc F. Nonsense and Missense Mutations in FCY2 and FCY1 Genes Are Responsible for Flucytosine Resistance and Flucytosine-Fluconazole Cross-Resistance in Clinical Isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(7):2982-90.
- Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 Genes: Effect on Cell Viability, Cell Growth, Sterol Composition, and Antifungal Susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(12): 2708–2717.
- Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2010; 46(3):225-234.
- Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, De Almeida LP, Da Matta DA, Colombo AL. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida* spp. Bloodstream Isolates from Latin American Hospitals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2003;98(3):401-405.



Goldman M, Pottage Júnior JC, Weaver DC. *Candida krusei* fungemia. Report of 4 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72(3):143-150.

Goldman GH, Da Silva Ferreira ME, Dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, Godoy Martinez PC, Goldman MH, Colombo AL. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2004; 50(1):25-32.

Gómez J, García-Vázquez E, Hernández A, Espinosa C, Ruiz J. Candidemias nosocomiales: nuevos retos de um problema emergente. *Revista Española de Quimioterapia* 2010; 23(4):158-168.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2003; 270(1512):313-21.

Heilmann CJ, Schneider S, Barker KS, Rogers PD, Morschhäuser J. An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1):353-9.

Holmes AR, Tsao S, Ong SW, Lamping E, Niimi K, Monk BC, Niimi M, Kaneko A, Holland BR, Schmid J, Cannon RD. Heterozygosity and functional allelic variation in the *Candida albicans* efflux pump genes CDR1 and CDR2. *Molecular Microbiology* 2006; 62(1):170–186.

Hope WW, Tabernero L, Denning DW, Anderson MJ. Molecular Mechanisms of Primary Resistance to Flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(11):4377-86.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In Nielsen R. *Statistical Methods In Molecular Evolution*. Springer 2005, p 183-232.

Hull CM, Bader O, Parker JE, Weig M, Gross U, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL. Two Clinical Isolates of *Candida glabrata* Exhibiting Reduced Sensitivity to Amphotericin B Both Harbor Mutations in ERG2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(12):6417–6421.

Izumikawa K, Kakeya H, Tsai HF, Grimberg B, Bennett JE. Function of *Candida glabrata* ABC transporter gene, PDH1. *Yeast* 2003; 20(3): 249-61.

Jacobsen MD, Rattray AM, Gow NA, Odds FC, Shaw, D. J. Mitochondrial haplotypes and recombination in *Candida albicans*. *Medical Mycology* 2008; 46: 647– 654.

Jiang C, Dong D, Yu B, Cai G, Wang X, Ji Y, Peng Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J Antimicrob Chemother* 2012; 68(4):778-85.

Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences 2004; 101:7329-7334.

Kahn JN, Garcia-Effron G, Hsu MJ, Park S, Marr KA, Perlin DS. Acquired Echinocandin Resistance in a *Candida krusei* Isolate Due to Modification of Glucan Synthase, Antimicrob. Agents Chemother. 2007; 51(5):1876-78.

Kurztzman CP, Albertyn J, Basehoar-Powers E. Multigene phylogenetic analysis of the Lipomycetaceae and the proposed transfer of *Zygozoma* species to *Lipomyces* and *Babjevia anomala* to *Dipodascopsis*. FEMS Yast Research 2007; 7(6):1027-34.

Lamping E, Ranchod A, Nakamura K, Tyndall JDA, Niimi K, Holmes AR, Niimi M, Cannon RD. Abc1p Is a Multidrug Efflux Transporter That Tips the Balance in Favor of Innate Azole Resistance in *Candida krusei*. Antimicrob. Agents Chemother 2009; 53(2):354-369.

Lott TJ, Frade JP, Lockhart SR. Multilocus sequence type analysis reveals both clonality and recombination in populations of *Candida glabrata* bloodstream isolates from U.S. surveillance studies, Eukaryot. Cell 2010;9(4):619-625.

Magri MMC, Gomes-Gouvêa MS, Freitas VLT, Motta AL, Moretti ML, Shikanai-Yasuda MA. Multilocus Sequence Typing of *Candida tropicalis* Shows the Presence of Different Clonal Clusters and Fluconazole Susceptibility Profiles in Sequential Isolates from Candidemia Patients in São Paulo, Brazil. J. Clin. Microbiol 2013; 51(1):268-277.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences 1998; 95:3140-3145.

Marie C, White TC. Genetic basis of antifungal drug resistance. Current Fungal Infection Reports 2009;3:123-131.

Miyaki CY, Russo CAM, Pereira SL. Reconstrução filogenética: Introdução ao método de máxima parcimônia. In Mاتيoli SR, Fernandes FMC. Biologia Molecular e Evolução. Holos, p.113-122, 2012.

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

Morris MI, Villmann M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections. Am J Health System Pharmacists 2006; 63:1693-1703.

Nguyen K, Zmeter G, Claris O, Kassai B. Epidemiology of invasive *Candida* infection in a neonatal intensive care unit in France. Acta Paediatrica 2012; 101:137-139.

Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; 58(77): 82.

Odds FC, Jacobsen MD. Multilocus sequence typing of pathogenic of *Candida* species. *Eukaryot. Cell* 2008; 7:1075–1084.

Papon N, Noël T, Florent M, Gibot-Leclerc S, Jean D, Chastin C, Villard J, Chapeland-Leclerc F. Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 369-371.

Perea S, López-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, Keller SM, Martinez M, Patterson TF. Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46 (6):1695–1703.

Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2002; 35:1073-80.

Pereira SL, Miyaki CY, Russo CAM. Reconstrução filogenética: Métodos probabilísticos. In Matioli SR, Fernandes FMC. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos 2012, p.133-146.

Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 2007; 10:121-130.

Pfaller MA. Epidemiology of candidiasis. *Journal of Hospital Infection* 1995; 30:329-338.

Pfaller MA. Anidulafungin: an echinocandin antifungal. *Expert Opin. Invest. Drugs* 2004; 13:1183-1197.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; 20(1):133-163.

Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Tandler M. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004; 99(2):147-152.

Pujol C, Pfaller M, Soll DR. Ca3 fingerprinting of *C. albicans* bloodstream isolates from the United States, Canada, South America and Europe reveals a European clade. *J. Clin. Microbiol* 2002; 40(8):2729-2740.

Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Microbiology* 2004; 2(42):80-86.

Russo CAM, Miyaki CY, Pereira SL. Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. In Matioli SR, Fernandes FMC. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos 2012, p. 123-132.

Saidane S, Weber S, De Deken X, St-Germain G, Raymond M. PDR16-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 2006; 60(6):1546-1562.

Sampaio P, Nogueira E, Loureiro AS, Delgado-Silva Y, Correia A, Pais C. Increased number of glutamine repeats in the C-terminal of *Candida albicans* Rlm1p enhances the resistance to stress agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2009; 96(4):395-404.

Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille, J. *Candida albicans* Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(8):2404–2412.

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; 143:405-41.

Sarvikivi E, Lyytikäinen O, Soll DR, Pujol C, Pfaller MA, Richardson M, Koukila-Kähkölä P, Luukkainen P, Saxén H. Emergence of Fluconazole Resistance in a Neonatal Intensive Care Unit *Candida parapsilosis* Strain That Caused. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43(6):2729.

Schindel DE, Miller SE. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 2005; 435(7038):17.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium Author List. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2012; 109(16):6241-6.

Schubert S, Rogers PD, Morschhäuser J. Gain-of-function mutations in the transcription factor MRR1 are responsible for overexpression of the MDR1 efflux pump in fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(12):4274-80.

Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR, Houbraken J, Lévesque CA, Moncalvo JM, Louis-Seize G, Hebert PD. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2007; 104:3901–3906.

Shokohi T, Soteh Mbh, Pouri Zs, Hedayati Mt, Mayahi S. Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2010; 28(2):147-151.

Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M. Origin and Diversification of Endomycorrhizal Fungi and Coincidence with Vascular Land Plants. *Nature* 1993; 363:67-69.

Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II, Kontoyiannis DP. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001–2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer* 2009; 115:4745–4752.

Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA, Odds FC. Multilocus sequence typing for differentiation of strains *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43:5593–5600.

Tavanti A, Gow NAR, Senesi S, Maiden MCJ, Odds FC. Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol* 2003; 8:3765–3776.

Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 2008; 21(4):606–625.

Tsai HF, Sammons LR, Zhang X, Suffis SD, Su Q, Myers TG, Marr KA, Bennett JE. Microarray and Molecular Analyses of the Azole Resistance Mechanism in *Candida glabrata* Oropharyngeal Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(8):3308–3317.

Van Het Hoog, MVH, Rast TJ, Martchenko M, Grindle S, Dignard D, Hogues H, Cuomo C, Berriman M, Scherer S, Magee BB, Whiteway M, Chibana H, Nantel A, Magee PT. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biology* 2007; 8(4):article R52.

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, Larcher G, Ernoult E, Bergès T, Chabasse D, Bouchara JP. A Nonsense Mutation in the ERG6 Gene Leads to Reduced Susceptibility to Polyenes in a Clinical Isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52(10):3701-9.

Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; 46:171–179.

Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* 2010; 47:117-26.

Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *Journal de Microbiol Immunol Infect* 2003; 36:223-228.

Zicker M, Colombo AL, Ferraz-Neto B, Camargo LF. A. Epidemiology of fungal infections in liver transplant recipients: a six-year study of a large Brazilian liver transplantation centre. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2011; 106 (3):339-345.

Zimbeck AJ, Iqbal N, Ahlquist AM, Farley MM, Harrison HL, Chiller T, Lockhart SR. FKS Mutations and Elevated Echinocandin MIC Values among *Candida glabrata* Isolates from U.S. Population-Based Surveillance. Antimicrob. Agents Chemother.2010; 54(12):5042–5047.

## HIPÓTESE

As mutações em genes envolvidos nas vias de biossíntese do ergosterol, como no caso o gene ERG11, podem determinar o aparecimento de leveduras com fenótipo resistente aos azóis.

## OBJETIVOS

### Geral

Identificar mutações na região codificadora do gene ERG11 em isolados clínicos *Candida* spp.

### Específicos

1. Inferir a relação filogenética dos isolados clínicos de *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* com sensibilidade reduzida aos azóis, bem como construir redes haplotípicas mostrando a relação entre as espécies por meio do gene ERG11.
2. Identificar mutações de ponto no gene ERG11 dos isolados clínicos de *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* com perfil de resistência estabelecido para os azóis.

# CAPÍTULO I

Artigo Aceito na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Qualis 2015: B1 para Biodiversidade.



**Novas mutações de ponto no gene ERG11 em isolados clínicos do gênero *Candida*  
com perfil de resistência aos azóis**

Danielly Beraldo dos Santos Silva<sup>1</sup>, Luana Mireli Carbonera Rodrigues<sup>1</sup>, Adriana Araújo de Almeida<sup>2</sup>, Kelly Mari Pires de Oliveira<sup>1</sup>, Alexéia Barufatti Grisolia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados - Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande - Mato Grosso do Sul, Brasil.

**RESUMO**

O objetivo do trabalho foi identificar mutações na região codificadora do gene ERG11 em isolados clínicos do gênero *Candida* com perfil de resistência estabelecido para o fluconazol, itraconazol e voriconazol. Este estudo promoveu a identificação de três novas mutações sinônimas no gene ERG11 em isolados clínicos em *Candida glabrata* e duas novas mutações não sinônimas em *Candida krusei*, A497C (Y166S) e G1570A (G524R). Para prever a consequência funcional das mutações não sinônimas no gene, foram calculados os scores da conservação evolutiva. Os resultados mostraram que G524R não é suscetível em ter algum tipo de efeito na funcionalidade da 14 $\alpha$ -demetilase, ao contrário, a Y166S pode ter efeito indicando sua possível relação com sensibilidade dose dependente ao voriconazol no isolado *C. krusei* (HU18). Essa alteração genética, se comprovada sua associação, pode contribuir na busca de novos alvos terapêuticos com atividade antifúngica em isolados de *Candida* resistentes.

**Palavras-Chave:** leveduras, *Candida krusei*, voriconazol, 14 $\alpha$ -demetilase, Y166S

## INTRODUÇÃO

Em países de América Latina, particularmente o Brasil, *Candida tropicalis* é responsável por 20 a 24% das infecções hematogênicas (Nucci & Colombo 2007; Pfaller & Diekema 2007), principalmente em pacientes neutropênicos e em outras condições, como diabetes mellitus e em pacientes idosos (Sipsas et al. 2009).

*Candida glabrata* e *Candida krusei*, também são patógenos hospitalares ocasionais, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas ou submetidos a transplante de medula óssea (Goldman et al. 1993, Nucci & Colombo 2007, Pfaller & Diekema 2007).

Nas últimas décadas, têm surgido muitos casos de resistência aos antifúngicos utilizados na profilaxia e tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. (Jiang et al. 2012, Almeida et al. 2013). Os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento da resistência em espécies de *Candida* (Barker & Rogers 2006, Berila et al. 2009, Ge et al. 2010, Carvalho et al. 2013) na principal classe de antifúngico utilizada, os azóis, pode ser atribuída a mutações e aumento da expressão de genes que codificam enzimas responsáveis pela biossíntese do ergosterol (Vandeputte et al. 2005, Barker & Rogers 2006).

Os azóis atuam na via de biossíntese do ergosterol da membrana fúngica, por meio da inibição da enzima, sintetizada pelo gene ERG11, a 14 $\alpha$ -demetilase (Erg11p ou 14DM), sendo citocromo P450 dependente. Deste modo as mutações ou aumento da expressão no gene ERG11 podem conferir resistência aos azóis pela diminuição da afinidade de ligação do fármaco, determinando o aparecimento de leveduras com fenótipo resistente aos azóis (Barker & Rogers 2006).

Nesse sentido, a busca por mutações no gene ERG11 associadas com a resistência aos azóis em espécies de *Candida* clinicamente relevantes, pode

proporcionar melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência aos antifúngicos e investigação epidemiológica, além servir como subsídio na prospecção de novas moléculas bioativas com atividade antifúngica, baseadas na caracterização genética e molecular de espécies de *Candida* resistentes. Portanto, o objetivo foi identificar mutações na região codificadora do gene ERG11 em isolados clínicos com perfil de resistência aos azóis.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção e cultivo

Os isolados clínicos de *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* utilizados neste estudo pertenciam a Micoteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal da Grande Dourados (LMA/UFGD). A sensibilidade antifúngica foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documentos: M27-A3 e M27-S4 (CLSI 2008a, CLSI 2012) e os antifúngicos testados foram: fluconazol, itraconazol e voriconazol. (Tabela 1).

Para garantir a pureza e viabilidade, os isolados foram cultivados em *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco®, Sparks, MD, USA) e em *CHROMagar Candida* (Difco®, Sparks, MD, USA). Os pontos de corte de susceptibilidade para fluconazol, itraconazol e voriconazol foram estabelecidos de acordo com o suplemento M27-S3 e M27-S4 (CLSI 2008b, CLSI 2012). Cepas de referências de *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* ATCC 750 (American Type Culture Collection – ATCC) foram utilizadas nas análises.

**Tabela 1.** Perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos de espécies do gênero *Candida*

Isolados	Espécies	Sitio de isolamento	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*		
			Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
HU25	<i>C. glabrata</i>	Urocultura	8 (S)	$\geq 1$ (R)	1 (-)
HU10	<i>C. glabrata</i>	Urocultura	8 (S)	$\leq 0.125$ (S)	1 (-)
HU26	<i>C. glabrata</i>	Urocultura	8 (S)	$\geq 1$ (R)	$\geq 4$ (-)
HU33	<i>C. glabrata</i>	Swab retal	8 (S)	$\leq 0.125$ (S)	$\geq 4$ (-)
HU37	<i>C. glabrata</i>	Urocultura	8 (S)	$\leq 0.125$ (S)	$\geq 4$ (-)
HU40	<i>C. glabrata</i>	Hemocultura	$\geq 64$ (R)	$\geq 1$ (R)	$\geq 4$ (-)
HU61	<i>C. glabrata</i>	Urocultura	16 (S)	$\geq 1$ (R)	1 (-)
HU66	<i>C. glabrata</i>	Urocultura	16 (S)	$\leq 0.125$ (S)	$\geq 4$ (-)
HU11	<i>C. krusei</i>	Swab nasal	$\geq 64$ (-)	$\leq 0.125$ (S)	1 (SDD)
HU18	<i>C. krusei</i>	Hemocultura	$\geq 64$ (-)	$\leq 0.125$ (S)	1 (SDD)
HU45	<i>C. krusei</i>	Swab retal	8 (-)	$\leq 0.125$ (S)	1 (SDD)
HU48	<i>C. tropicalis</i>	Urocultura	8 (R)	$\leq 0.125$ (S)	$\geq 4$ (R)
HU54	<i>C. tropicalis</i>	Ponta de cateter	16 (R)	$\leq 0.125$ (S)	1 (R)
HU80	<i>C. tropicalis</i>	Urocultura	8 (R)	$\leq 0.125$ (S)	1 (R)

\*MIC: Concentração Inibitória Mínima; (S) Sensível; (SDD) Sensibilidade Dose Dependente; (R) Resistente; (-) Não existe evidencia significativa para determinar o valor de corte para a espécie.

Para garantir a pureza e viabilidade, os isolados foram cultivados em *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco®, Sparks, MD, USA) e em *CHROMagar Candida* (Difco®, Sparks, MD, USA). Os pontos de corte de susceptibilidade para fluconazol, itraconazol e voriconazol foram estabelecidos de acordo com o suplemento M27-S3 e M27-S4 (CLSI 2008b, CLSI 2012). Cepas de referências de *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* ATCC 750 (American Type Culture Collection – ATCC) foram utilizadas nas análises.

### Extração de DNA

O DNA de todos os isolados e cepas de referência foi extraído a partir de três Unidades Formadoras de Colônias ( $2,40 \times 10^7$  cel/cm<sup>3</sup>) reativadas e cultivadas em caldo *Sabouraud Dextrose* por meio do YeaStar™ Genomic DNA Kit. A pureza (260nm/280nm) e a concentração (ng/ $\mu\text{L}$ ) do DNA total foram determinadas em nanofotômetro (NanoPhotometer™ P-300 UV-Vis da IMPLEN®).

## Reação em Cadeia pela Polimerase

Os *primers* utilizados para amplificação da região codificadora do gene ERG11 nas espécies de *Candida* estão descritos na Tabela 2. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador BIORAD® modelo MyCycler™ Thermal Cycler. As soluções foram preparadas em volume de 25 µL, constituídas por 12,5 µL de PCR Master MIX (Kapa Biosystems®), 1 µL de cada *primer* (10 pmoles) e 2 µL DNA genômico (10 a 20 ng). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da sua qualidade e integridade.

Para todas as reações, o programa de amplificação do termociclador foi: desnaturação inicial de 94°C por 5', 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30'', anelamento a 50°C por 40'' e extensão a 72°C por 50'', seguido da extensão final a 72°C por 10'.

**Tabela 2.** *Primers* utilizados para reação amplificação da região codificadora do gene ERG11 das espécies do gênero *Candida*

Espécie	<i>Primers</i>	Fragmento (pb)	Referência			
<i>C. tropicalis</i>	Ct-ERG11-1F	TCTGACATGGTGTGTGTGTG	678	Vandeputte et al. 2005		
	Ct-ERG11-1R	ATTGATGCCATCAATGGCAG				
	Ct-ERG11-2F	ATCCCACAGGCTTATTTGAAA	614			
	Ct-ERG11-2R	GGTCTCTTTCCTTGGTTTTG				
	Ct-ERG11-3F	TGCTGAAGAAGCTTATACCC	499			
	Ct-ERG11-3R	CAAGGAATCAATCAAATCTCTC				
	Genbank M23673.1	Ct-ERG11-3.1F	TGACGCTGCTCAAAGAAAAGA		493	*
		Ct-ERG11-3.1R	ATGAGCATAACCGGCAGAAA			
		Ct-ERG11-4F	GGTGGTCAACATACTTCTGC		630	
		Ct-ERG11-4R	AGCAGGTTCTAATGGTAAGG			
Ct-ERG11-5F		AAACGGTGATAAGGTTCCAG	626	Vandeputte et al. 2005		
Ct-ERG11-5R	TCCCAAGACATCAAACCCTG					
<i>C. glabrata</i>	Cg-ERG11-0F	TCGGTCCATCTCTGTTTCTT	699		*	
	Cg-ERG11-0R	GAACACTGGGGTGGTCAAGT				
	Cg-ERG11-1F	ACTACAATAACATGTCCACTGA	408			
	Cg-ERG11-1R	GGTGGTCAAGTGGGAGTAA				
	Genbank EU219981.1	Cg-ERG11-2F	AGCTGCTTACTCCCCTTGACC	412		
		Cg-ERG11-2R	AGCTTGTTGGGCATGGTCTCTC			
		Cg-ERG11-3F	GCCCAACAAGCTATCTCTGGTA	418		
		Cg-ERG11-3R	TGTTTGGAATAGCGACATCTCTC			
		Cg-ERG11-4F	CCAAACACTTCTACGTTGTCCC	424		Carvalho et al. 2013
	Cg-ERG11-4R	GCATCTAGTACTTTTGTCTGGATG				
<i>C. krusei</i>	Ck-ERG11-1F	CCTCTCTAGCAACAACAATGTCC	428			
	Ck-ERG11-1R	GCCCTTACCGAAAACAGGAGTG				
	Ck-ERG11-2F	ACTCCTGTTTTCGGTAAGGGCG	421			
	Ck-ERG11-2R	CACCGGCACGCTTTGTATTG				
	Genbank EU309502.1	Ck-ERG11-3F	CGTGCCGGTGGTGAATCAA	397		
		Ck-ERG11-3R	GGCCCTTTGGAACAATGTACGA			
Ck-ERG11-4F		GTACATTGTTCCAAAGGGCCATT	410			
Ck-ERG11-4R		GCTAGTCTTTTGTCTTCTCTCC				

\*Pares de *Primers* propostos neste trabalho obtidos por meio do *Software Primer 3*

### Sequenciamento e análise dos dados

Todos os produtos resultantes da amplificação foram purificados por meio de Álcool Isoamílico e sequenciados pelo método de Sanger (Sanger et al. 1977) no ABI 3500 *automated DNA sequencer* (Applied Biosystems®) com mesmos *primers* utilizados na PCR e o *BigDye Terminator cycle sequencing*. A leitura das sequências foi feita pelo software *Sequencing Analysis v5.3* (Life Technologies®).

Para cada isolado foi estabelecida uma sequência consenso (*Assembly*) por meio do software CAP 3 (Huang & Madan 1999), utilizando as sequências geradas pela amplificação com os *primers* da Tabela 1.

As sequências consenso foram traduzidas para aminoácidos no ExPasy *Translate Tool* (<http://web.expasy.org/translate/>), respeitando a tradução diferencial das leveduras do gênero *Candida* para o códon CUN (Moura et al. 2010). O alinhamento foi realizado no Clustal W2 (Larkin et al. 2007) utilizando as sequências obtidas neste estudo e sequências disponíveis no Genbank.

A árvore filogenética de aminoácidos foi construída no MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013), pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei 1987) o qual foi utilizado o modelo de *Poisson* (Zuckerandl & Pauling 1965). Também foram construídas redes haplotípicas para análise da relação entre os haplótipos gerados pelo Network 4.1.1.2 com o método *Median-Joining* (Bandelt et al. 1999).

As mutações de ponto foram localizadas na sequência de aminoácidos por meio do alinhamento no Clustal W2. Também foi estimada a probabilidade das mutações não sinônimas encontrados neste estudo terem um efeito na funcionalidade da 14 $\alpha$ -demetilase. O subSPEC score (substitution position-specific conservation evolutionary) foi calculado no PANTHER software (Thomas et al., 2006) com base no score do alinhamento de proteínas evolutivamente relacionadas utilizando Hidden Markov Modelo (HMM), tal como descrito em Thomas et al. , 2003 e Thomas & Kejariwal (2004).

### **Números de acesso das sequências**

As sequências obtidas neste estudo provenientes das diferentes espécies de *Candida* foram submetidas ao *Genbank* com os números de acesso KR998002,

KR998003, KR998004, KR998005, KR998006, KR998007, KR998008, KR998009, KR998010 (*C. glabrata*), KR998011, KR998012, KR998013, KR998014 (*C. krusei*), KR998015, KR998016, KR998017, KR998018 (*C. tropicalis*).

## RESULTADOS

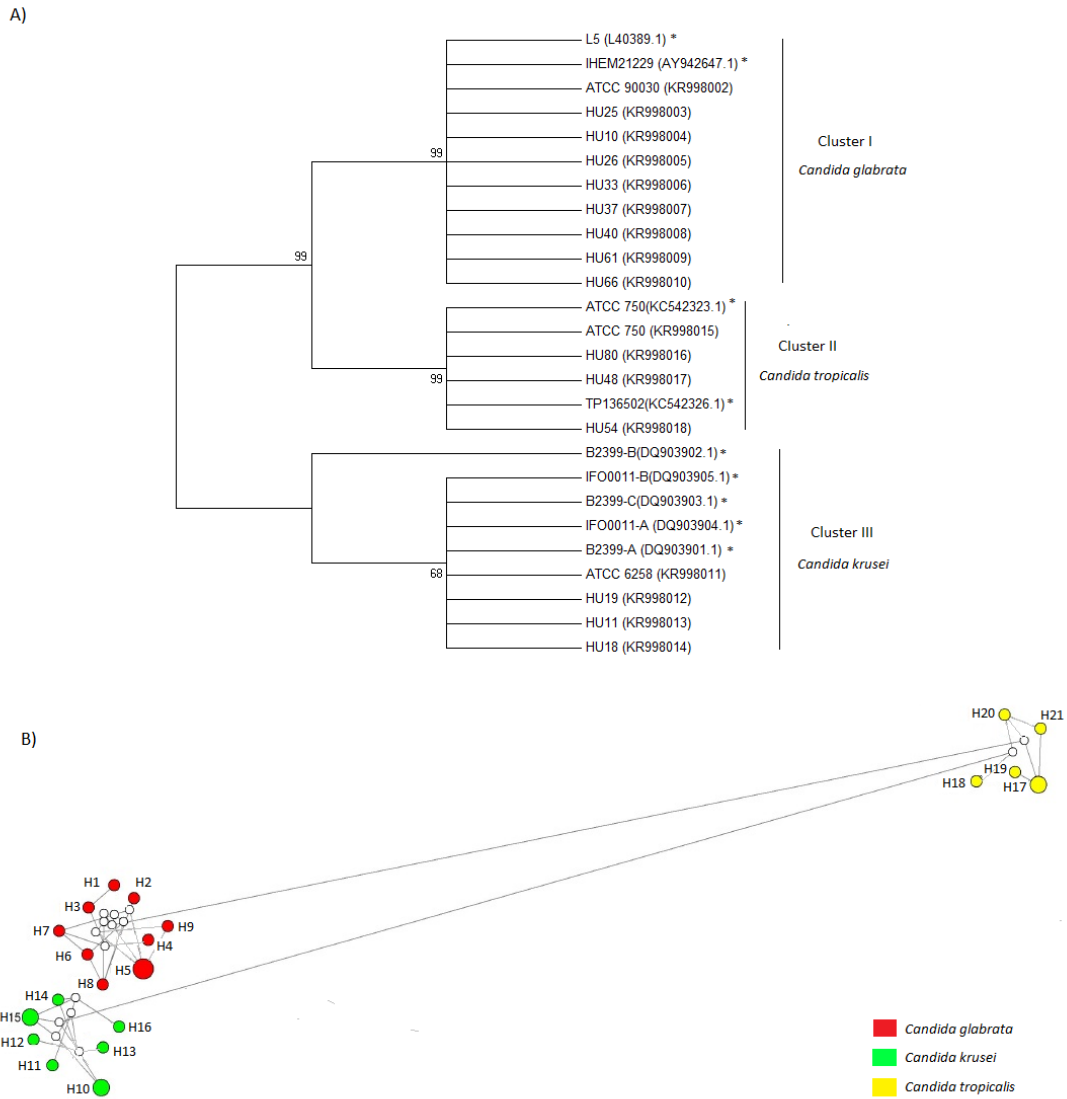
### Análise Filogenética

A extensão sequenciada e avaliada do gene ERG11, considerando o domínio da 14 $\alpha$ -demetilase de acordo com as sequências disponíveis no *Genbank* para cada espécie, foi de 1603 pb para *C. glabrata*, 1587 pb para *C. krusei* e *C. tropicalis*. Ao traduzir as sequências foram obtidos resíduos de 533 aminoácidos para *C. glabrata*, 528 aminoácidos para *C. krusei* e *C. tropicalis*.

A distância média entre as sequências foi de 0,3 (30%) (Figura 1.A), A árvore filogenética apresentou valores de *bootstrap*  $\geq 70$  nos nós principais. Nos grupos I e II, pertencente às espécies de *C. glabrata* e *C. tropicalis* não foram observadas divergências intraespecífica entre os isolados clínicos, cepas de referência ATCC e sequências do obtidas do *Genbank* para comparação. Nos isolados pertencentes ao grupo III (*C. krusei*), foi observado distância entre a sequência DQ903902.1 (*C. krusei*), depositada no *Genbank* por Lamping et al. (2009), e os isolados deste estudo e cepa de referência ATCC 6258.

Com base nos pontos mutacionais presentes nas sequências do gene ERG11, a Figura 1.B representa a relação entre os haplótipos formados para diferentes espécies de *Candida*. As análises revelaram que as espécies pertenceram a haplótipos diferentes, devido aos diferentes padrões da sequencia codificadora do gene ERG11 entre as espécies em estudo.





**Fig. 1:** Filogenia da região codificadora do gene ERG11 em espécies de *Candida*. **A)** Árvore filogenética baseada no alinhamento de sequências de aminoácidos do gene EGR11 dos isolados em estudo e sequências do GenBank, construída pelo método de Neighbor-Joining utilizando o modelo evolutivo de Poisson com 1000 repetições *bootstrap*. (\*) Sequências do Genbank utilizadas para comparação. **B)** Rede haplotípica construída pelo método de Median-Joining baseado no alinhamento de sequências do gene EGR11 dos isolados em estudo e sequências do Genbank, demonstrando os 21 haplótipos encontrados para as espécies de *Candida*. A área dos círculos dos haplótipos é proporcional a sua frequência. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplótipo. Os pontos brancos são vetores médios que representam haplótipos hipotéticos introduzidos pelo algoritmo executado.

## Mutações de ponto no gene **ERG11**

Considerando todas as sequências avaliadas, inclusive as sequências obtidas do *Genbank* para comparação nas análises, no total foram identificadas 25 alterações nucleotídicas diferentes (17 transições e 8 transversões). Em relação à natureza dessas alterações, considerando apenas as sequências obtidas neste estudo, 20 foram identificadas como mutações sinônimas (que não alteram o aminoácido traduzido) e duas mutações não sinônimas (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.

O maior número de mutações pontuais (11) foi encontrado em *C. glabrata* (Tabela 3). As alterações mais frequentes foram T768C e T1557A, ausente apenas na cepa ATCC 90030. A mutação A1581G foi encontrada em todos os isolados clínicos avaliados de *C. glabrata*, inclusive na cepa ATCC 90030. Tanto essa mutação quanto as mutações C108G e C423T (Tabela 3), não tinham sido relatadas anteriormente. Para *C. glabrata* nenhuma das mutações encontradas promoveu alteração da sequência de aminoácidos da 14 $\alpha$ -demetilase.

Os isolados HU54 e HU80 *C. tropicalis* revelaram uma única mutação de ponto e no isolado HU48 de *C. tropicalis* foram identificadas duas mutações (Tabela 3). Nenhuma das alterações nucleotídicas encontradas nas sequências dos isolados de *C. tropicalis* promoveram a troca de aminoácidos.

**Tabela 3.** Mutações de ponto encontradas na região codificadora do gene ERG11 de isolados clínicos resistentes e sensíveis de *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*

Genbank (Isolados)	<i>Candida glabrata</i> (1603 pb)										
	Mutações de ponto										
	C108G*	C201G	C423T*	C678T	T768C	G927A	A1023G	T1275C	T1521A	T1557A	A1581G*
L40389.1(L5) <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AY942647.1(IHEM21229) <sup>2</sup>	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
KR998002 (ATCC 90030)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
KR998003 (HU10)	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
KR998004 (HU25)	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
KR998005 (HU26)	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
KR998006 (HU33)	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
KR998007 (HU37)	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
KR998008 (HU40)	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
KR998009 (HU61)	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
KR998010 (HU66)	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
Genbank (Isolados)	<i>Candida tropicalis</i> (1587 pb)										
	Mutações de ponto										
	T225C	G264A	A395T	T783C	G1362A	T1554C					
KC542323.1 (ATCC 750) <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-					
KC542326.1(TP13650) <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	+					
KR998015 (ATCC 750)	-	-	-	-	-	-					
KR998016 (HU80)	-	-	-	+	-	-					
KR998017 (HU48)	-	-	-	-	+	+					
KR998018 (HU54)	-	-	-	-	+	-					

<sup>1</sup>Sequências utilizadas para comparação, susceptível aos azóis ( Geber et al. 1995, Forastiero et al. 2013). <sup>2</sup>Sequências utilizadas para comparação, resistente aos azóis (Vandeputte et al. 2007, Forastiero et al. 2013).+ Substituição de base presente. - Substituição de base ausente. \*Novas substituições relatadas.

Para os isolados clínicos de *C. krusei* com sensibilidade dose dependente ao voriconazol foram identificadas seis mutações sinônimas e duas não sinônimas ainda não descritas: Y166S e G524R (serina por tirosina na posição 166 e glicina por arginina na posição 524 da sequência da 14 $\alpha$ -demetilase) (Tabela 4). A mutação G524R foi observada na cepa ATCC 6258 e em isolados com sensibilidade dose dependente em estudo, demonstrando que a mesma pode não ter relação direta com a susceptibilidade aos azóis. Em comparação com as sequências do *Genbank*, a mutação Y166S foi observada apenas no isolado HU18 levando a hipótese de que o mesmo pode induzir uma diminuição da afinidade aos azóis.

**Tabela 4.** Mutações de ponto encontradas na região codificadora do gene ERG11 de isolados clínicos resistentes e sensíveis de *Candida krusei*

Genbank (Isolados-Alelo)	Mutações de ponto							
	T44C	A497C*	T642C	A756T	T939C	T1389C	A1470C	G1570A*
DQ903901.1 (B2399-A) <sup>1</sup>	+	-	+	+	-	-	+	-
DQ903902.1 (B2399-B) <sup>1</sup>	+	-	+	-	-	+	-	-
DQ903903.1 (B2399-C) <sup>1</sup>	+	-	-	-	+	+	+	-
DQ903904.1 (IFO0011-A) <sup>1</sup>	+	-	+	+	-	-	+	-
DQ903905.1 (IFO0011-B) <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	+	+	-
KR998011 (ATCC 6258)	+	-	-	-	-	+	+	+
KR998012 (HU45)	+	-	+	+	-	+	+	+
KR998013 (HU11)	+	-	+	+	-	+	+	+
KR998014 (HU18)	+	+	+	-	-	+	+	+

<sup>1</sup>Sequências utilizadas para comparação (Lamping et al. 2009). + Substituição de base presente. - Substituição de base ausente. \*Novas mutações nucleotídicas com alteração de aminoácido, A497C (Y166S) e G1570A (G524R), Ver Arquivo Suplementar 1.

De acordo com Brunham et al. (2005), Thomas et al., (2003) e Thomas & Kejariwal et al. (2004), o subPSEC score estima a probabilidade de uma única substituição de aminoácido ter um efeito funcional na proteína. Os valores de subPSEC variam de 0 (neutro) a -10 (maior probabilidade de ser prejudicial). *Score* de -3 é o *cutoff point* para ocorrer efeito na funcionalidade da proteína. *Cutoff point* de -3 corresponde a uma probabilidade de 50% que o score é prejudicial ( $P_{\text{deleterious}} = 0,5$ ).

A probabilidade de que uma mutação Y166S poderá prejudicar a função da 14 $\alpha$ -demetilase é estimada por  $P_{\text{deleterious}}$ , de tal modo que o subPSEC *score* obtido foi de -4.08665 corresponde a um  $P_{\text{deleterious}}$  de 0.74775, s indicando a suscetibilidade de ser prejudicial. No entanto, para a mutação G524R, não foi gerado subPSEC *score*. Esta substituição ocorreu numa posição que não apareceu no alinhamento de sequências múltiplas, ou seja, a substituição ocorreu em uma posição maior do que em relação ao HMM consenso. Na maioria dos casos, estas posições não são modeladas pelos HMMs porque os mesmos não aparecem na maioria das sequências relacionadas. Como resultado, as substituições em posições maiores não são geralmente suscetíveis de serem prejudiciais.

## DISCUSSÃO

### Análise Filogenética

A árvore filogenética gerada a partir das sequências da região codificadora do gene ERG11 (Figura 1.A), indicou que esse gene apresenta condições favoráveis para ser incluído em estudos filogenéticos demonstrando alta consistência e confiabilidade nas análises devido aos altos valores *bootstrap* apresentados (Hillis & Bull, 1993).

As sequências alinhadas de aminoácidos do gene ERG11, comparadas quantitativamente por meio da Distância de Poisson, refletiram uma diferença de 30%

dos resíduos comparados. Embora a proporção de diferenças seja boa indicadora da variabilidade intraespecífica, esse valor assume que a probabilidade de substituição é constante ao longo da sequência, o que nem sempre acontece, havendo regiões mais conservadas que as outras (Russo et al. 2012).

Como se trata de uma região codificadora foi possível observar uma variação intraespecífica para o gênero *Candida* (divisão em grupos taxonômicos observados na Figura 1.A), pois existe limitação funcional diferencial e estrutural nas regiões da proteína (Li 2000). O mesmo aconteceu com a rede haplotípica, foi observado diferenças entre as espécies sugerindo que esse gene pode ser utilizado para identificação de haplogrupos intraespecíficos.

As sequências de aminoácidos intraespecífica obtidas neste estudo são altamente conservadas. Como o código genético apresenta a propriedade de degeneração, as taxas de substituições são reduzidas, portanto as topologias envolvendo aminoácidos que determinam a função da proteína, neste caso a 14 $\alpha$ -demetilase (componente que mantém a integridade e função da membrana plasmática dessas leveduras) possuem menor divergência (Russo et al. 2012), como observado na Figura 1.A.

### **Mutações de ponto no gene ERG11**

As mutações na sequência do gene ERG11 que conduzem a troca de aminoácido representam um dos principais mecanismos associados à resistência de isolados clínicos de *Candida* aos azóis (Morio et al. 2010). Em um estudo na Rússia, Шкель et al. (2013) relataram a mutação C201G em *C. glabrata* resistentes aos azóis. As demais mutações sinônimas encontradas nos isolados (Tabela 4) já haviam sido descritas anteriormente por Vandeputte et al. (2007) e Berila & Subik (2010), com exceção das mutações

nucleotídicas C108G, C423T e A1581G. Berila & Subik (2010) observaram que as mutações T768C, A1023G e T1557A estiveram presentes em todos os isolados de *C. glabrata* avaliados por eles inclusive nos sensíveis aos azóis, demonstrando que essas alterações possivelmente não teriam associação com a susceptibilidade aos antifúngicos.

Assim como neste estudo, Forastiero et al. (2013) encontraram as mutações sinônimas T783C, T1554C e G1362A em um isolado clínico (número de acesso KC542326.1) de *C. tropicalis* com resistência ao fluconazol e voriconazol. Do mesmo modo, ao investigarem os mecanismos de resistência aos azóis, Loeffler et al. (2000) e Vandeputte et al. (2005) encontraram a mutação T1554C na sequência codificadora do gene ERG11 em isolados clínicos resistentes aos azóis, sendo que Loeffler et al. (2000) avaliou 21 isolados, dos quais 5 apresentaram essa mutação.

De acordo com os resultados obtidos e literatura citada, essas mutações sinônimas no gene ERG11 em *C. tropicalis* vem sendo encontradas frequentemente. Desse modo, mesmo que não tenham relação direta com a resistência, esses isolados com susceptibilidade reduzida poderiam estar sofrendo uma pressão seletiva do ambiente. O acúmulo dessas mutações em um mesmo códon, com o passar do tempo poderia resultar, na tradução de um novo aminoácido, o qual possivelmente apresentaria um impacto sobre a funcionalidade da enzima.

Lamping et al. (2009), já havia relatado as seis mutações sinônimas encontradas neste estudo em isolados clínicos de *C. krusei*. A mutação não sinônimas G1470A (G524R) foi encontrada na cepa de referência *C. krusei* ATCC 6258 que é sensível aos azóis e em isolados com sensibilidade dose dependente ao voriconazol. A substituição de aminoácido inserida na posição 524 não é suscetível de ser deletéria, portanto não tem impacto na funcionalidade na 14 $\alpha$ -demetilase em *C. krusei*. Diante dos resultados,

deve-se considerar que outros mecanismos moleculares podem estar envolvidos na explicação do fenótipo resistente, como bombas de efluxo, outras mutações e superexpressão de genes envolvidos na biossíntese do ergosterol (Lamping et al. 2009).

A mutação A497C (Y166S) foi encontrada apenas no isolado HU18 (*C. krusei*) com sensibilidade dose dependente ao voriconazol levando a hipótese de que a mesma pode induzir uma diminuição da afinidade aos azóis. Os resultados da análise de subPSEC mostraram que a Y166S pode ter efeito na funcionalidade da 14 $\alpha$ -demetilase. Neste sentido, essa substituição pode estar relacionada à susceptibilidade reduzida do isolado HU18 ao voriconazol.

Outra evidencia é que a localização da mutação A497C (Y166S), está no sítio ativo da 14 $\alpha$ -demetilase (Xiao et al. 2004) e também pelo fato da tirosina ser mais hidrofóbica que a serina podendo resultar numa possível alteração na estrutura tridimensional da enzima. A elucidação da estrutura cristalina da 14 $\alpha$ -demetilase de *Mycobacterium tuberculosis*, proporcionou a modelagem dessa mesma enzima em espécies de *Candida* (Boscott & Grant 1994, Xiao et al. 2004). Nesse sentido, a partir da identificação de mutações na 14 $\alpha$ -demetilase, que conferem resistência a classe dos azóis em espécies de *Candida*, é possível construir modelos baseados na homologia da estrutura tridimensional dessa enzima, e assim, conhecer as possíveis mudanças estruturais.

Apesar das evidencias, o fenótipo com a sensibilidade reduzida observado no isolado HU18 (*C. krusei*) não pode ser explicada apenas pela presença da mutação A497C (Y166S). Possivelmente a utilização de clonagem e indução dessa mutação não sinônima permitirá melhorar os resultados.



## CONCLUSÃO

Este estudo revelou novas mutações sinônimas e não sinônimas em *Candida* sp. Os resultados sugeriram que a mutação Y166S encontrada em um isolado de *C. krusei* com sensibilidade dose dependente para o voriconazol pode ter efeito na funcionalidade da 14 $\alpha$ -demetilase, levando a hipótese que a mesma pode ter relação com o fenótipo com a sensibilidade reduzida neste isolado, no entanto novas investigações devem ser realizadas.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

## REFERÊNCIAS

- Almeida AA, Mesquita CSS, Svidzinski TIE, Oliveira KMP 2013. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates in the University Hospital in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso)* 46:335-339.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1): 37-48.
- Barker SKP, Rogers DP 2006. Recent Insights into the Mechanisms of Antifungal Resistance. *Fungal Infections* 8: 449–456.
- Berila N, Borecka S, Dzugasova V, Bojnansky J, Subik J 2009. Mutations in the CgPDR1 and CgERG11 genes in azole-resistant *Candida glabrata* clinical isolates from Slovakia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 574–578.
- Berila N, Subik J 2010. Molecular analysis of *Candida glabrata* clinical isolates. *Mycopathologia* 170:99–105.

Boscott, PE, e GH Grant. de 1994. Modelagem do citocromo P450 14 demethylase alfa (*Candida albicans*) de P450. J. Mol. Graph. 12:185-195.

Brunham LR , Singaraja RR , Pape TD , Kejariwal A , Thomas PD 2005. Accurate Prediction of the Functional Significance of Single Nucleotide Polymorphisms and Mutations in the ABCA1 Gene. PLoS Genetics 1(6):739-747.

Carvalho VO, Okay TS, Melhem MSC, Szeszs MW, Del Negro GMB 2013. The new mutation L321F in *Candida albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance. Revista Iberoamericana de Micología 30(3): 209–212.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. 3. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008b. Reference method for broth dilution Antifungal Susceptibility testing of yeasts; 3rd Informational Supplement, M27-S3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Reference method for broth dilution Antifungal Susceptibility testing of yeasts; Fourth International Supplement, M27-S4. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

Forastiero A, Mesa-Arango A. C, Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Bernal-Martinez L, Pelaez T, Lopez JF, Grimalt O, Gomez-Lopez A, Cuesta I, Zaragoza O, Mellado E 2013. *Candida tropicalis* Antifungal Cross-Resistance Is Related to Different Azole Target (Erg11p) Modifications, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 57(10): 4769–4781.

Ge SH, Wan Z, Li J, Xu J, Li RY, Bai FY 2010. Correlation between Azole Susceptibilities, Genotypes, and ERG11 Mutations in *Candida albicans* Isolates Associated with Vulvovaginal Candidiasis in China. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 54(8): 3126–3131.

Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, Bennett JE 1995. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 Genes: Effect on Cell Viability, Cell Growth, Sterol Composition, and Antifungal Susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother 39(12): 2708–2717.

Goldman M, Pottage Júnior JC, Weaver DC 1993. *Candida krusei* fungemia. Report of 4 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 72(3):143-150.

Hillis DM, Bull JJ 1993. An empirical test of bootstrapping as method for assessing confidence in phylogenetics analysis. Syst. Bot. 42:182-192.

Huang X, Madan A 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res, 9(9):868-77.

Jiang C, Dong D, Yu B, Cai G, Wang X, Ji Y, Peng Y 2012. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J Antimicrob Chemother* 68(4):778-85.

Lamping E, Ranchod A, Nakamura K, Tyndall JDA, Niimi K, Holmes AR, Niimi M, Cannon RD 2009. Abc1p Is a Multidrug Efflux Transporter That Tips the Balance in Favor of Innate Azole Resistance in *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 53(2): 354–369.

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 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.

Li WH 2000. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts.

Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC 2003. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22 (11): 693-696.

Loeffler J, Hagemeyer L, Hebart H, Henke N, Schumacher U, Einsele H 2000. Rapid Detection of Point Mutations by Fluorescence Resonance Energy Transfer and Probe Melting Curves in *Candida* Species. *Clinical Chemistry* 46(5): 631-35.

Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Pape PL 2010. 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66 (2010) 373–384.

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

Nucci M, Colombo AL 2007. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 58(77): 82.

Pfaller MA, Diekema DJ 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20(1):133-163.

Russo CAM, Miyaki CY, Pereira SL. Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. In Matioli SR, Fernandes FMC. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos (2012): 123-132.

Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463–5467.

Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II, Kontoyiannis DP 2009. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new

antifungal agents (2001–2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer* 115:4745– 4752.

Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer k, Muruganujan A, Narechania A 2003. PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies. *Genome Research* 2129-2141.

Thomas PD, Kejariwal A 2004. Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: Evolutionary evidence for differences in molecular effects. *PNAS* 101(43):15398-15403.

Thomas PD, Kejariwal A, Guo N, Mi H, Campbell MJ, Muruganujan A, Lazareva-Ulitsky B 2006. Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools *Nucl. Acids Res.* 34 (suppl 2): W645-W650.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

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

Vandeputte P, Tronchin G, Berge`s T, Hennequin C, Chabasse D, Bouchara JP 2007. Reduced Susceptibility to Polyenes Associated with a Missense Mutation in the ERG6 Gene in a Clinical Isolate of *Candida glabrata* with Pseudohyphal Growth. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 51(3): 982–990.

Xiao L, Madison V, Chau AS, Loebenberg D, Palermo RE, McNicholas PM 2004 Three-Dimensional Models of Wild-Type and Mutated Forms of Cytochrome P450 14 $\alpha$ -Sterol Demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* Provide Insights into Posaconazole Binding. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(2): 568–574.

Yang YL 2003. Virulence factors of *Candida* species. *Journal de Microbiol Immunol Infect* 36: 223-228.

Zuckerandl E, Pauling L 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel, Academic Press, New York. 97-166.

Шкель АВ, Василевская АВ, Гилеп АА, Черновецкий МА, Лукьяненко И.Г, член-корреспондент НАН Беларуси С.А. Усанов 2013. Молекулярный анализ стерол 14- $\alpha$  деметилаз (сур51) патогенных грибов, вызывающих нозокомиальные инфекции. *Биохимия* 8(1):153-158.

## Arquivo Suplementar 1

**AS1.** Alinhamento Múltiplo das sequencias de aminoácidos por meio do Clustal W2, as setas indicam as novas mutações encontradas neste trabalho, A497C (Y166S) e G1570A (G524R).

Isolate	Genbank	Multiple alignment	
B2399-B	DQ903902.1	SAEDAYTHLTPVFGKGVYDCPNWKLMEQKKFAKVALTKESFIRYVPLIKDEMLKYFNA	(180)
HU18	KR998014	SAEDAYTHLTPVFGKGVYDCPNWKLMEQKKFAKVALTKESFIRSVPLIKDEMLKYFNA	
ATCC6258	KR998011	SAEDAYTHLTPVFGKGVYDCPNWKLMEQKKFAKVALTKESFIRYVPLIKDEMLKYFNA	
HU45	KR998012	SAEDAYTHLTPVFGKGVYDCPNWKLMEQKKFAKVALTKESFIRYVPLIKDEMLKYFNA	
HU11	KR998013	SAEDAYTHLTPVFGKGVYDCPNWKLMEQKKFAKVALTKESFIRYVPLIKDEMLKYFNA	
B2399-A	DQ903901.1	SAEDAYTHLTPVFGKGVYDCPNWKLMEQKKFAKVALTKESFIRYVPLIKDEMLKYFNA	
B2399-C	DQ903903.1	SAEDAYTHLTPVFGKGVYDCPNWKLMEQKKFAKVALTKESFIRYVPLIKDEMLKYFNA	
IF00011-A	DQ903904.1	SAEDAYTHLTPVFGKGVYDCPNWKLMEQKKFAKVALTKESFIRYVPLIKDEMLKYFNA	
IF00011-B	DQ903905.1	SAEDAYTHLTPVFGKGVYDCPNWKLMEQKKFAKVALTKESFIRYVPLIKDEMLKYFNA	
		*****	
B2399-B	DQ903902.1	AYTQLGTLVHYIQNFKWTAKVPPIDYTSMTLPTQPAEIKWEGRQKN	(528)
HU18	KR998014	AYTQLGTLVHYIQNFKWTAKVPPIDYTSMTLPTQPAEIKWERRQKN	
ATCC6258	KR998011	AYTQLGTLVHYIQNFKWTAKVPPIDYTSMTLPTQPAEIKWERRQKN	
HU45	KR998012	AYTQLGTLVHYIQNFKWTAKVPPIDYTSMTLPTQPAEIKWERRQKN	
HU11	KR998013	AYTQLGTLVHYIQNFKWTAKVPPIDYTSMTLPTQPAEIKWERRQKN	
B2399-A	DQ903901.1	AYTQLGTLVHYIQNFKWTAKVPPIDYTSMTLPTQPAEIKWEGRQKN	
B2399-C	DQ903903.1	AYTQLGTLVHYIQNFKWTAKVPPIDYTSMTLPTQPAEIKWEGRQKN	
IF00011-A	DQ903904.1	AYTQLGTLVHYIQNFKWTAKVPPIDYTSMTLPTQPAEIKWEGRQKN	
IF00011-B	DQ903905.1	AYTQLGTLVHYIQNFKWTAKVPPIDYTSMTLPTQPAEIKWEGRQKN	
		*****	

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações encontradas neste estudo corroboram com os conhecimentos existentes para identificação de espécies e dos fatores genéticos associados à resistência em *Candida* spp. A aplicação dessas ferramentas, ou seja, as informações moleculares (genotípicas) obtidas proporcionou inovação para a região da Grande Dourados e para o Estado do Mato Grosso do Sul no que tange às áreas de tecnologias de biologia molecular.

O conhecimento do perfil de resistência aos azóis pode contribuir não apenas como guia para o médico na escolha da terapia apropriada, mas também possui papel fundamental em termos epidemiológicos, no que diz respeito aos mecanismos responsáveis pelo surgimento desta resistência e sua disseminação oferecendo subsídios para melhoria das medidas de controle e prevenção do problema.

A busca por mutações no gene ERG11, proporcionou a descoberta de duas novas mutações não sinônimas, em que uma delas pode ter relação com a resistência aos azóis, no entanto novas investigações precisam ser realizadas. Este estudo pode ser útil para melhor compreensão e investigação epidemiológica, também servir como subsídio na prospecção de novas moléculas bioativas com atividade antifúngica baseadas na caracterização genética e molecular de espécies de *Candida* resistentes.

## ANEXO I

### Submissão dos artigos e normas da revista

1. Artigo de Revisão “**Fatores genéticos da resistência em espécies de *Candida***” foi submetido na revista *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* em 5 de Maio de 2015. Qualis A2 para Biodiversidade.

#### 1.1. Submissão:

Ms. Ref. No.: DMID-15-342

Title: GENETIC FACTORS OF RESISTANCE IN *Candida* SPECIES

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Dear Mrs. Danielly Beraldo dos Santos Silva,

Your submission entitled "GENETIC FACTORS OF RESISTANCE IN *Candida* SPECIES" has been assigned the following manuscript number: DMID-15-342. You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/dmid/>.

Your username is: [daniellyberaldo@gmail.com](mailto:daniellyberaldo@gmail.com)

If you need to retrieve password details please go to:  
[http://ees.elsevier.com/dmid/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/dmid/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Administrative Support Agent

Administrative Support Agent [08-Aug-14]

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

#### 1.2. Normas da Revista:

**Escopo:** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* publica artigos sobre os últimos desenvolvimentos em microbiologia clínica, diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas. Estudos em bacteriologia, imunologia, imunoserology, doenças infecciosas, micologia, parasitologia e virologia.

**Tipos de papers:** Os trabalhos podem ser apresentados em forma de artigos de corpo inteiro (incluindo artigos de revisão), ou notas curtas.

**Preparação do Manuscrito:**

Os artigos apresentados devem ser escritos em Inglês. A submissão a este jornal prossegue totalmente on-line este pode ser um arquivo PDF ou um documento do Word, em qualquer formato ou layout que pode ser usado por árbitros para avaliar o seu manuscrito. Ele deve conter dados suficientes de qualidade elevados para arbitragem. Não há exigências sobre referência de formatação na submissão. As referências podem ser em qualquer estilo ou formato, desde que o modelo é consistente. Além disso, o autor (s) nome (s), título da revista / título do livro, título do capítulo / título do artigo, ano de publicação, número do volume / capítulo de livro e a paginação deve estar presente. Não há requisitos de formatação, mas todos os manuscritos devem conter os elementos essenciais necessários para transmitir o seu manuscrito, por exemplo, resumo, palavras-chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Conclusões, figuras e tabelas com legendas. Para maiores detalhes acessar: <http://www.elsevier.com/journals/diagnostic-microbiology-and-infectious-disease/0732-8893/guide-for-authors>.



2. Artigo “Novas mutações de ponto no gene *ERG11* em isolados clínicos do gênero *Candida* com perfil de resistência aos azóis” foi submetido na **Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** em outubro de 2015 e **ACEITO** em Fevereiro de 2016 (DOI: 10.1590/0074-02760150400. Qualis B1 para Biodiversidade.

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: 1-8, 2016

1

## Novel point mutations in the *ERG11* gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species

Danielly Beraldo dos Santos Silva<sup>1</sup>, Luana Mireli Carbonera Rodrigues<sup>1</sup>,  
Adriana Araújo de Almeida<sup>2</sup>, Kelly Mari Pires de Oliveira<sup>1</sup>, Alexéia Barufatti Grisolia<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil <sup>2</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

*The azoles are the class of medications most commonly used to fight infections caused by Candida sp. Typically, resistance can be attributed to mutations in ERG11 gene (CYP51) which encodes the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase, the primary target for the activity of azoles. The objective of this study was to identify mutations in the coding region of the ERG11 gene in clinical isolates of Candida species known to be resistant to azoles. We identified three new synonymous mutations in the ERG11 gene in the isolates of Candida glabrata (C108G, C423T and A1581G) and two new nonsynonymous mutations in the isolates of Candida krusei - A497C (Y166S) and G1570A (G524R). The functional consequence of these nonsynonymous mutations was predicted using evolutionary conservation scores. The G524R mutation did not have effect on 14 $\alpha$ -demethylase functionality, while the Y166S mutation was found to affect the enzyme. This observation suggests a possible link between the mutation and dose-dependent sensitivity to voriconazole in the clinical isolate of C. krusei. Although the presence of the Y166S in phenotype of reduced azole sensitivity observed in isolate C. krusei demands investigation, it might contribute to the search of new therapeutic agents against resistant Candida isolates.*

Key words: yeasts - *Candida krusei* - voriconazole - 14 $\alpha$ -demethylase - Y166S

## **Anexo II**

Danielly Beraldo dos Santos Silva

### **Currículo Lattes**

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/1113361254962972>

## **Danielly Beraldo dos Sants Silva**

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1113361254962972>

Última atualização do currículo em 14/06/2015

---

Possui graduação em Biotecnologia (2013) e mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção (2015) pela Universidade Federal da Grande Dourados (Dourados-MS). Atualmente é doutoranda do Programa de pós Graduação em Genética e Melhoramento Animal da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (Campus de Jaboticabal-SP), tendo como linha de pesquisa Genética Molecular e Seleção Genômica. Tem experiência na área de genética e biologia molecular animal e de microrganismos, atuando principalmente nos seguintes temas: recursos genéticos, biologia molecular aplicada, marcadores moleculares e bioinformática.

---

### **Formação acadêmica/titulação**

2015

Doutorado em andamento em Genética e Melhoramento Animal (Conceito CAPES 5). Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP-FCAV, Brasil. Título: Expressão diferencial de genes relacionados com características de carcaça e carne de bovinos da raça Nelore, Orientadora: Lúcia Galvão de Albuquerque. Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2013-2015

Mestrado em Biologia geral (Conceito CAPES 3). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil. Título: Filogenia e bioprospecção de mutações no gene ERG11 de isolados clínicos de *Candida* spp. Orientadora: Alexéia Barufatti Grisolia. Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2009 - 2013

Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil. Título: Marcadores moleculares no gene da leptina associados com características de carcaça em bovinos da raça Nelore. Orientadora: Alexéia Barufatti Grisolia.

---

### **Formação Complementar**

2015

Livestock Genomics Conservation Course. (Carga horária: 40h). Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP-FCAV, Brasil.

2014

Língua Inglesa-Nível Básico II. (Carga horária: 40h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

Princípios Básicos de Liofilização-Secar ou Liofili. (Carga horária: 2h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

2013

Higiene e manipulação de alimentos. (Carga horária: 4h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

2012

I Curso de verão em Bioprospecção do Cerrado. (Carga horária: 40h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

2011

PCR em tempo real aplicado à diagnóstico de doença. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Perícia e Biologia Forense. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Elaboração de produtos fermentados. (Carga horária: 4h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

2010

O efeito do *Phyllanthus niruri* (quebre pedra). (Carga horária: 4h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

Espectroscopia. (Carga horária: 4h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

Biocombustíveis. (Carga horária: 4h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

Fermentação em estado sólido. (Carga horária: 8h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

Técnicas de PCR em Tempo Real. (Carga horária: 4h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

Citogenética de peixes. (Carga horária: 16h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

Língua Inglesa-Nível Básico. (Carga horária: 40h). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

---

### **Atuação Profissional**

**Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.**

**Vínculo institucional**

2012 - 2013

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

2012 - 2012

Vínculo: Voluntária, Enquadramento Funcional: Monitora da disciplina de Genética Geral, Carga horária: 12

2011 - 2012

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional

2010 - 2011

Vínculo: Voluntária, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica Voluntária, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

### **Atividades**

07/2009 - 07/2009

Estágio realizado

Estágio extracurricular realizado no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Produção Animal na Faculdade de Ciências Agrárias.

---

### **Projetos de pesquisa**

2012 - 2015

Rede de estudos de resistência em bactérias e leveduras de interesse clínico no Mato Grosso do Sul. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Coordenador: Kelly Mari Pires de Oliveira

2011 - 2013

Caracterização citogenética e molecular dos Surubins (*Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*) e identificação de contaminação genética de surubins híbridos em ambiente natural – MS. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Coordenador: Alexeia Barufatti Grisolia

2009 - 2011

Estudo de estratégias alternativas para o manejo genético-demográfico de populações cativas no Brasil. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Coordenador: Leonardo de Oliveira Seno - Coordenador

2009 - 2011

Associação de Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs) no Gene da Leptina com Concentração Sérica de Leptina, Ganho de Peso e Rendimento de Carcaça em Bovinos de Corte. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Coordenador: Alexeia Barufatti Grisolia

### **Outros Projetos**

2010 - 2011

Projeto de Ensino Grupo de Estudos e Treinamento em Genética e Biologia Molecular Situação: Concluído; Natureza: Outra. Coordenador: Alexeia Barufatti Grisolia

2009 - 2009

A importância e perspectiva da biotecnologia no Brasil. Situação: Concluído; Natureza: Outra. Coordenador: Alexeia Barufatti Grisolia

---

### **Idiomas**

Espanhol: Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Português: Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Inglês: Lê Bem.

---

### **Produções Bibliográficas**

---

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. SILVA, D. B. S. ; CRISPIM, B. A. ; SILVA, L. E. ; OLIVEIRA, J. A. ; SIQUEIRA, F. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Genetic variations in the leptin gene associated with growth and carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, p. 3002-3012, 2014.

2. SILVA, L. E. ; SILVA, D. B. S. ; CRISPIM, B. A. ; VAINI, J. O. ; GRISOLIA, A. B. ; Seno, L. O. . Variação de concentração de proteinase k em protocolos de extração de DNA de bovino. *Archives of Veterinary Science*, v. 18, p. 15-19, 2013.

3. SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; CRISPIM, B. A. ; VAINI, J. O. ; GRISOLIA, A. B. ; OLIVEIRA, K. M. P. . Biotecnologia aplicada a la alimentacion y salud humana. *Revista Chilena de Nutrición (Impresa)*, v. 39, p. 94-98, 2012.

4. CRISPIM, B. A. ; SILVA, D. B. S. ; BANARI, A. C. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. Discriminação alélica em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por meio de marcadores microssatélites. *Journal of the Selva Andina Research Society*, v. 1, p. 3-13, 2012.

#### **Trabalhos completos publicados em anais de congressos**

1. SILVA, D. B. S. ; FROES, C. Q. ; OLIVEIRA, V. S. ; SOUZA, K. P. . III Curso de Verão em Bioprospecção: Prospectando Recursos naturais para valorização e conservação do meio. In: 8 ENEPE UFGD e 5 EPEX UEMS, 2014, Dourados. Anais do 8 ENEPE UFGD e 5 EPEX UEMS, 2014.

2. OLIVEIRA, J. A. ; ROCHA, P. S. ; ROMAN, A. I. ; SILVA, D. B. S. ; ALVES JUNIOR, V. V. ; PEREIRA, Z. V. . Percepção de alunos d ensino fundamental sobre a reciclagem e sustentabilidade em Dourados/MS. In: 9 Feira de Sementes Nativas e Crioulas e de Produtos Agrogeológicos e 2 Seminário sobre Uso e conservação do Cerrado do Sul do MS, 2013, Juti/MS. Anais da 9 Feira de Sementes Nativas e Crioulas e de Produtos Agrogeológicos e 2 Seminário sobre Uso e conservação do Cerrado do Sul do MS, 2013.

3. VAINI, J. O. ; VALEJO, P. A. P. ; GALETTI, V. S. ; SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; GRISOLIA, A. B. . Pescadores: O caso do surubim híbrido interespecífico em ambiente natural do MS. In: ENEPE, 2012, Dourados. Anais ENEPE 2012, 2012.
4. SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; OLIVEIRA, J. A. ; VAINI, J. O. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Relação de SNP e locus STR no gene da leptina com o desenvolvimento ponderal e tipificação de carcaça em Nelore. In: ENEPE, 2012, Dourados. Anais ENEPE 2012, 2012.
5. SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; CRISPIM, B. A. ; VAINI, J. O. ; GRISOLIA, A. B. ; Duarte, J. M. B. ; Fernández, J. ; Seno, L. O. . Ferramentas para a gestão genético-demográfico de populações cativas no Brasil. In: 2 Encontro de Ensino de Graduação, 4 Encontro de Pós-Graduação, 5 Encontro de Iniciação Científica, 5 Encontro de Extensão (ENEPE), 2011, Dourados. ENEPE. Dourados: UFGD, 2011.
6. VAINI, J. O. ; CRISPIM, B. A. ; SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; GRISOLIA, A. B. Identificação molecular de surubim híbrido interespecífico (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) no Rio Dourados-MS. In: 2 Encontro de Ensino de Graduação, 4 Encontro de Pós-Graduação, 5 Encontro de Iniciação Científica, 5 Encontro de Extensão (ENEPE), 2011, Dourados. ENEPE. Dourados: UFGD, 2011.
7. SILVA, L. E. ; SILVA, D. B. S. ; CRISPIM, B. A. ; VAINI, J. O. ; ALONSO, R. V. ; MATTOS, M. C. ; GRISOLIA, A. B. . Padronização de protocolo de sexagem de embriões bovinos por meio da técnica de PCR. In: 2 Encontro de Ensino de Graduação, 4 Encontro de Pós-Graduação, 5 Encontro de Iniciação Científica, 5 Encontro de Extensão (ENEPE), 2011, Dourados. ENEPE. Dourados: UFGD, 2011.
8. CUNHA, C. M. ; CRISPIM, B. A. ; SILVA, L. E. ; VAINI, J. O. ; SILVA, D. B. S. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Polimorfismo no exon 2 do gene da Leptina e características produtivas de bovinos da raça Nelore. In: 2 Encontro de Ensino de Graduação, 4 Encontro de Pós-Graduação, 5 Encontro de Iniciação Científica, 5 Encontro de Extensão (ENEPE), 2011, Dourados. ENEPE. Dourados: UFGD, 2011.
9. CRISPIM, B. A. ; SILVA, D. B. S. ; Vargas Junior, F. M. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Análise de marcadores moleculares de microssátelites por eletroforese capilar em ovinos naturalizados do pantanal sul-matogrossense. In: 2 Encontro de Ensino de Graduação, 4 Encontro de Pós-Graduação, 5 Encontro de Iniciação Científica, 5 Encontro de Extensão (ENEPE), 2011, Dourados. ENEPE. Dourados: UFGD, 2011.
10. SILVA, D. B. S. ; SILVA, U.G. ; GRISOLIA, A. B. ; Duarte, J. M. B. ; Fernández, J. ; Seno, L. O. . Método rápido e direto para elaboração de arquivos de genealogia (STUDBOOK). In: ENEPE (Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão)1 Encontro de Ensino de Graduação/ 3 Encontro de Pós-graduação/ 4 Encontro de Iniciação Científica/ 4 Encontro de Extensão da UFGD, 2010, Dourados. 1 Encontro de Ensino de Graduação/ 3 Encontro de Pós-graduação/ 4 Encontro de Iniciação Científica/ 4 Encontro de Extensão da UFGD. Dourados: Editora UFGD, 2010.

### **Resumos expandidos publicados em anais de congressos**

1. SILVA, D. B. S. ; RODRIGUES, L. M. C. ; CRISPIM, B. A. ; SILVA, L. E. ; OLIVEIRA, K. M. P. ; GRISOLIA, A. B. . A quantidade de células de leveduras do gênero *Candida* pode influenciar a integridade e quantidade de DNA extraído?. In: 8 ENEPE UFGD e 5 EPEX UEMS, 2014, Dourados. Anais do 8 ENEPE UFGD e 5 EPEX UEMS, 2014.
2. SILVA, D. B. S. ; CRISPIM, B. A. ; OLIVEIRA, J. A. ; BANARI, A. C. ; GRISOLIA, A. B. ; Seno, L. O. . Análise da variabilidade genética de ovinos da raça Bergamácia. In: VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas em Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudameriaericanos, 2013, Campo Grande. Anais, CD Rom do VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas em Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudameriaericanos, 2013.
3. CRISPIM, B. A. ; SILVA, D. B. S. ; BANARI, A. C. ; OLIVEIRA, J. A. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Diversidade genética em ovinos localmente adaptados do Pantanal Sulmatogrossense. In: VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas em Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudameriaericanos, 2013, Campo Grande. Anais, CD Rom VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas em Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudameriaericanos, 2013.
4. BANARI, A. C. ; CRISPIM, B. A. ; OLIVEIRA, J. A. ; SILVA, D. B. S. ; GRISOLIA, A. B. ; Seno, L. O. . Utilização de marcadores moleculares para a identificação da origem de ovinos no manejo genético dos rebanhos. In: VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas em Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudameriaericanos, 2013, Campo Grande. Anais, CD Rom do VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas em Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudameriaericanos, 2013.
5. OLIVEIRA, J. A. ; CRISPIM, B. A. ; SILVA, D. B. S. ; BANARI, A. C. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Diversidade de DNA mitocondrial e cromossomo Y em ovinos do Mato Grosso do Sul. In: VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas em Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudameriaericanos, 2013, Campo Grande. Anais, CD Rom VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas em Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudameriaericanos, 2013.
6. CRISPIM, B. A. ; CARNEVALI, T. O. ; SILVA, D. B. S. ; BANARI, A. C. ; NASCIMENTO, A. V. ; SILVA, L. E. ; VAINI, J. O. ; GRISOLIA, A. B. ; VIEIRA, M. C. . Método simples e eficiente de extração de DNA total de tecidos foliares de guavira. In: 15 Workshop de Plantas Mediciniais do Mato Grosso do Sul, 2012, Dourados. Anais do 15 Workshop de Plantas Mediciniais do Mato Grosso do Sul. Dourados: UFGD, 2012.
7. CRISPIM, B. A. ; SILVA, D. B. S. ; BANARI, A. C. ; NASCIMENTO, A. V. ; GRISOLIA, A. B. ; Seno, L. O. . Análise de parâmetros populacionais a partir do pedigree de ovinos criolos do Pantanal. In: XI Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 2012, João Pessoa. Anais do XI Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. São Paulo: SBMA, 2012.



8. CRISPIM, B. A. ; VAINI, J. O. ; SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; CUNHA, C. M. ; OLIVEIRA, J. A. ; SOARES, J. S. ; ROSA, Y. B. C. J. ; GRISOLIA, A. B. . Protocolos para identificação de cromossomos metafásicos mitóticos em *Dendrobium nobile* (Orchidacea). In: 14º Workshop de plantas medicinais de Mato Grosso do Sul, 2011, Dourados. 14º Workshop de plantas medicinais de Mato Grosso do Sul. Dourados: UFGD, 2011.

### **Resumos publicados em anais de congressos**

1. SILVA, D. B. S. ; RODRIGUES, L. M. C. ; ALMEIDA, A. A. ; OLIVEIRA, K. M. P. ; GRISOLIA, A. B. . Polymorphisms in the ERG11 gene of *Candida tropicalis* associated with resistance profile to amphotericin B. In: 60 Congresso Brasileiro de Genética, 2014, Guarujá/SP. Anais do 60 Congresso Brasileiro de Genética, 2014.

2. VAINI, J. O. ; SILVA, D. B. S. ; CRISPIM, B. A. ; BANARI, A. C. ; GRISOLIA, A. B. . CHARACTERIZATION OF GENETIC VARIABILITY OF PSEUDOPLATYSTOMA CORRUSCANS (SILURIFORMES: PIMELODIDAE) IN RIVERS MS/BRAZIL. In: 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013, Águas de Lindóia. Anais do 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013.

3. VASCONCELOS, A. A. ; SILVA, D. B. S. ; GRISOLIA, A. B. . Concepção dos acadêmicos de Ciências Biológicas e Biotecnologia sobre conceitos de genética e biologia molecular. In: 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013, Águas de Lindóia. Anais do 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013.

4. OLIVEIRA, J. A. ; CRISPIM, B. A. ; DOURADO, P. L. R. ; SILVA, D. B. S. ; GRISOLIA, A. B. . MITOCHONDRIAL GENE SEQUENCES FOR IDENTIFICATION OF ANIMAL SPECIES. In: 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013, Águas de Lindóia. Anais do 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013.

5. SILVA, D. B. S. ; VAINI, J. O. ; CRISPIM, B. A. ; BANARI, A. C. ; SANTOS, J. C. G. ; GRISOLIA, A. B. . GENETIC DIVERSITY IN PURE CACHARA SPECIMENS FROM NATURAL ENVIRONMENT OF MATO GROSSO DO SUL STATE, BRAZIL. In: 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013, Águas de Lindóia. Anais do 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013.

6. NASCIMENTO, A. V. ; CRISPIM, B. A. ; SILVA, D. B. S. ; BANARI, A. C. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . ASSOCIATION OF NELLORE COWS PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE TRAITS WITH GENETIC POLYMORPHISMS. In: 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013, Águas de Lindóia. Anais do 59 Congresso Brasileiro de Genética, 2013.

7. SILVA, D. B. S. ; CRISPIM, B. A. ; VAINI, J. O. ; MATTOS, M. C. ; OLIVEIRA, J. A. ; NASCIMENTO, A. V. ; GRISOLIA, A. B. ; Seno, L. O. . Polymorphisms in Nellore cattle leptin gene associated with body weight and leptin concentration. In: 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu. Anais do 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012.

8. OLIVEIRA, J. A. ; VAINI, J. O. ; CRISPIM, B. A. ; SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; CUNHA, C. M. ; GRISOLIA, A. B. ; Seno, L. O. . Genetics and molecular biology interest group for propagation of knowledge and research. In: 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu. Anais do 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012.

9. CRISPIM, B. A. ; BANARI, A. C. ; SILVA, D. B. S. ; VAINI, J. O. ; SILVA, L. E. ; OLIVEIRA, J. A. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Microsatellite markers and genetic variability in pantanal creole sheep. In: 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu. Anais do 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012.

10. SILVA, L. E. ; SILVA, D. B. S. ; CRISPIM, B. A. ; NASCIMENTO, A. V. ; MATTOS, M. C. ; BANARI, A. C. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Association between BM1500 microsatellite with productive and reproductive traits and plasma leptin levels in indicine heifers. In: 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu. Anais do 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012.

11. VAINI, J. O. ; VALEJO, P. A. P. ; GALETTI, V. S. ; BENITES, C. ; CRISPIM, B. A. ; SILVA, L. E. ; SILVA, D. B. S. ; GRISOLIA, A. B. . Detection of interspecific hybrid surubins (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) in natural environment of the Mato Grosso do Sul state, Brazil. In: 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu. Anais do 58 Congresso Brasileiro de Genética, 2012.

12. VAINI, J. O. ; CRISPIM, B. A. ; SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; GALETTI, V. S. ; VALEJO, P. A. P. ; GRISOLIA, A. B. . Avaliação de protocolos para extração de DNA em nadadeiras de surubins. In: 20 Congresso de Biólogos do CRBio, 2011, Corumbá. 20º Congresso de Biólogos do CRbio. São Paulo: Páginas e Letras, 2011.

13. CRISPIM, B. A. ; CHAGAS, F. F. ; VAINI, J. O. ; SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; CUNHA, C. M. ; Seno, L. O. ; OLIVEIRA, K. M. P. ; GRISOLIA, A. B. . Detecção de Salmonella por meio de reação em cadeia pela polimerase em cepas isoladas de carcaça de frango. In: 20 Congresso de Biólogos do CRBio, 2011, Corumbá. 20º Congresso de Biólogos do CRbio. São Paulo: Páginas e Letras, 2011.

14. SILVA, L. E. ; SILVA, D. B. S. ; CRISPIM, B. A. ; VAINI, J. O. ; CUNHA, C. M. ; SOARES, J. S. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Efeitos da variação na concentração e tempo de incubação em proteinase k para extração de DNA de leucócitos. In: 20 Congresso de Biólogos do CRBio, 2011, Corumbá. 20º Congresso de Biólogos do CRbio. São Paulo: Páginas e Letras, 2011.

15. SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; CRISPIM, B. A. ; CUNHA, C. M. ; VAINI, J. O. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Efeito da leptina na deposição de gordura corporal em bovinos. In: 20 Congresso de Biólogos do CRBio, 2011, Corumbá. 20º Congresso de Biólogos do CRbio. São Paulo: Páginas e Letras, 2011.

16. MATTOS, M. C. ; SILVA, L. E. ; SILVA, D. B. S. ; CRISPIM, B. A. ; GARCIA, J. F. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Sex identification by DNA amplification from bovine blood tissue and embryos. In: 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. Resumos do 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011.

17.Seno, L. O. ; CUNHA, C. M. ; CRISPIM, B. A. ; OLIVEIRA, J. A. ; SILVA, L. E. ; SILVA, D. B. S. ; MATTOS, M. C. ; GRISOLIA, A. B. . Genotype variation in the leptin gene in Nelore cattle. In: 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. Resumos do 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011.

18.CRISPIM, B. A. ; VAINI, J. O. ; TEIXEIRA, T. Z. ; SILVA, D. B. S. ; SILVA, L. E. ; MUSSURY, R. M. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. . Genotoxic effects and alteration in leaf anatomy by vehicle traffic pollution of *Trasdescantia pallida* (Rose) D.R Hunt. In Dourados, Mato Grosso do Sul. In: 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. Resumos do 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011.

19.CRISPIM, B. A. ; SOARES, J. S. ; VAINI, J. O. ; SILVA, L. E. ; SILVA, D. B. S. ; GRISOLIA, A. B. . Genética vai a escola-multidisciplinariedade ao alcance de todos. In: XI Congresso Iberoamericano de Extension Universitaria, 2011, Santa Fe. XI Congresso Iberoamericano de Extension Universitaria, 2011.

20.SILVA, D. B. S. ; Seno, L. O. ; GRISOLIA, A. B. ; Vargas Junior, F. M. ; OLIVEIRA, C. A. L. ; OLIVEIRA, D. P. ; MARTINS, C. F. ; PINTO, G. S. . Estrutura genética dos ovinos naturalizados do Pantanal. In: 56 Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá/SP. Anais do Congresso Brasileiro de Genética, 2010.

21.Seno, L. O. ; SILVA, D. B. S. ; GRISOLIA, A. B. ; Vargas Junior, F. M. ; OLIVEIRA, C. A. L. ; OLIVEIRA, D. P. ; MARTINS, C. F. ; PINTO, G. S. . Diversidade genética dos ovinos naturalizados do Pantanal. In: 56 Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá/SP. Anais do Congresso Brasileiro de Genética, 2010.

22.SILVA, D. B. S. ; Seno, L. O. ; Vargas Junior, F. M. ; OLIVEIRA, C. A. L. ; OLIVEIRA, D. P. ; PINTO, G. S. . Caracterização da Diversidade Genética da População de Ovinos Naturalizados do Pantanal. In: VI SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS DA UNESP DRACENA & VII ENCONTRO DE ZOOTECNIA, 2010, Dracena. Anais do VI SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS DA UNESP DRACENA & VII ENCONTRO DE ZOOTECNIA UNESP DRACENA, 2010.

### **Demais tipos de produção técnica**

1. SILVA, D. B. S. ; GRISOLIA, A. B. . Técnicas básicas de Biologia Molecular aplicada a bioprospecção de genes. 2014. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

2.SILVA, D. B. S. ; SANTOS, L. A. C. . Biotecnologia: Da Fermentação ao DNA recombinante. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

3.SILVA, D. B. S. . Ferramentas computacionais na genética da conservação. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

4.SILVA, D. B. S. . Bioinformática. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Outra).